

**Die Rolle der 12/15-Lipoxygenase in der  
Pathogenese der Insulinresistenz:  
Untersuchungen an der Alox15-Knockout-Maus**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines  
Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

**Sonja Vahsen**

Aus der Klinik für Kleintiere, Innere Medizin der Kleintiere  
und klinische Laboratoriumsdiagnostik

Betreuer: HDoz Dr. med. vet. A. Moritz

und

dem Deutschen Diabetes-Zentrum

an der Heinrich-Heine-Universität Düsseldorf

Institut für klinische Biochemie und Pathobiochemie

Betreuer: Prof. Dr. rer. nat. J. Eckel

**Die Rolle der 12/15-Lipoxygenase in der  
Pathogenese der Insulinresistenz:  
Untersuchungen an der Alox15-Knockout-Maus**

**INAUGURAL-DISSERTATION**

zur Erlangung des Grades eines

Dr. med. vet.

beim Fachbereich Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

Eingereicht von

**Sonja Vahsen**

Tierärztin aus Mönchengladbach

Gießen 2005

Mit Genehmigung des Fachbereichs Veterinärmedizin  
der Justus-Liebig-Universität Gießen

---

**Dekan:**

Prof. Dr. M. Reinacher

**Gutachter:**

HDoz Dr. A. Moritz

Prof. Dr. J. Eckel

**Tag der Disputation:** 08.07.2005

„Ich erkläre:

Ich habe die vorgelegte Dissertation selbständig und ohne unerlaubte fremde Hilfe und nur mit den Hilfen angefertigt, die ich in der Dissertation angegeben habe. Alle Textstellen, die wörtlich oder sinngemäß aus veröffentlichten oder nicht veröffentlichten Schriften entnommen sind, und alle Angaben, die auf mündlichen Auskünften beruhen, sind als solche kenntlich gemacht. Bei den von mir durchgeführten und in der Dissertation erwähnten Untersuchungen habe ich die Grundsätze wissenschaftlicher Praxis, wie sie in der Satzung der Justus-Liebig-Universität Gießen zur Sicherung guter wissenschaftlicher Praxis“ niedergelegt sind, eingehalten.“

*Meiner Familie  
und  
meinem Freund Stefan Cremers*



# INHALTSVERZEICHNIS

<b>1.</b>	<b>EINLEITUNG.....</b>	<b>1</b>
<b>2.</b>	<b>SCHRIFTTUM .....</b>	<b>3</b>
2.1	Diabetes mellitus.....	3
2.2	Die Insulinsignalkaskade.....	13
2.3	GLUT4-Translokation und Zytoskelett.....	18
2.4	Lipoxygenasen .....	26
<b>3</b>	<b>EIGENE UNTERSUCHUNGEN.....</b>	<b>31</b>
3.1	Material .....	31
3.1.1	Chemikalien .....	31
3.1.2	Antikörper.....	33
3.1.3	Gele und Sonstiges.....	35
3.1.4	Geräte und Laborbedarf.....	35
3.2	Methoden .....	36
3.2.1	Versuchstiere .....	36
3.2.2	In vivo Stimulation .....	36
3.2.2.1	Gewebepräparationen.....	37
3.2.2.1.1	Präparation des Ventrikelgewebes.....	37
3.2.2.1.2	Präparation der Leber .....	37
3.2.2.1.3	Präparation des Skelettmuskels.....	37
3.2.3	Aufschluss der Gewebe .....	38
3.2.4	Proteinbestimmung .....	38
3.2.5	Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen.....	39
3.2.6	Transfer der Proteine auf Membranen .....	40
3.2.7	Immunodetektion.....	41
3.2.7.1	Strippen der Blotmembran .....	41
3.2.8	Bestimmung der Blutglukose.....	42
3.2.9	Genotypisierung der Alox15-Knockout-Mäuse .....	42
3.2.9.1	Isolierung von genomischer DNA aus Lebergewebe .....	42
3.2.9.2	Polymerase-Kettenreaktion .....	43

3.2.10	Berechnung und Statistik .....	44
3.3	Ergebnisse .....	45
3.3.1	Lipoxygenaseexpression in Herz und Skelettmuskel der Alox15-Knockout-Maus .....	46
3.3.2	Genotypisierung der Alox15-Knockout-Maus .....	48
3.3.3	Untersuchung des Plasmaglukosespiegels in Alox15-Knockout- Mäusen im Basalzustand und nach Insulinstimulus .....	49
3.3.5	Auswirkungen der Inaktivierung der 12/15-Lipoxygenase auf die Insulinsignaltransduktion in Herz und Skelettmuskel .....	53
3.3.5.1	Untersuchung der Akt-Expression.....	53
3.3.5.2	Untersuchung der Akt-Phosphorylierung im Basalzustand und nach Insulinstimulus.....	56
3.3.5.3	Untersuchung der GSK3-Expression .....	61
3.3.5.4	Untersuchung der GSK3-Phosphorylierung im Basalzustand und nach Insulinstimulus.....	65
<b>4.</b>	<b>DISKUSSION .....</b>	<b>75</b>
4.1	Vorteile eines Knockout-Mausmodells gegenüber .....	76
	kultivierten Zelllinien.....	76
4.2	Die Alox15-Knockout-Maus.....	79
4.3	Einfluss der 12/15-Lipoxygenase auf die GLUT4-Expression .....	80
4.4	Bedeutung der 12/15-Lipoxygenase für Elemente der Insulinsignalkaskade .....	82
4.4.1	Einfluss der 12/15-Lipoxygenase auf Expression und Phosphorylierung von Akt .....	82
4.4.2	Einfluss der 12/15-Lipoxygenase auf Expression und Phosphorylierung von GSK3.....	84
4.5	Entwicklung einer Insulinresistenz in der Alox15-Knockout-Maus?.....	85
4.5.1	Plasmaglukosespiegel .....	86
4.5.2	GLUT4 .....	87
4.5.3	Akt und GSK3 .....	88
4.6	Fazit .....	90



---

4.7	Ausblick.....	92
<b>5.</b>	<b>ZUSAMMENFASSUNG.....</b>	<b>93</b>
<b>6.</b>	<b>SUMMARY .....</b>	<b>95</b>
<b>7.</b>	<b>SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS.....</b>	<b>97</b>
<b>8.</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN .....</b>	<b>119</b>
<b>9.</b>	<b>VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN.....</b>	<b>121</b>
<b>10.</b>	<b>DANKSAGUNG .....</b>	<b>123</b>



## 1. EINLEITUNG

Der Diabetes mellitus gilt als eine der häufigsten Erkrankungen in den sog. Industrieländern. Zur Zeit sind weltweit ca. 150 Millionen Menschen betroffen, wobei sich die Zahl bis 2025 verdoppelt haben wird (ZIMMET et al., 2001). Dabei handelt es sich zum größten Teil um Erkrankungen an Diabetes mellitus Typ 2. Besondere Bedeutung gewann der Diabetes mellitus Typ 2 in den letzten zwei Jahrzehnten aufgrund der steigenden Lebenserwartung und dem damit verbundenen erhöhten Auftreten von Folgeschäden. Da sich diese Erkrankung über viele Jahre bzw. Jahrzehnte manifestiert, sind Präventivmaßnahmen, die eine detaillierte Kenntnis der Ätiologie und Pathogenese voraussetzen, von großer Bedeutung. Trotz intensiver Forschung der letzten Jahrzehnte sind einige Mechanismen der Pathogenese immer noch unklar. Das Zusammenspiel zahlreicher pathophysiologischer Vorgänge erschwert die Zuordnung von Ursache und Wirkung.

Nach heutigen Erkenntnissen handelt es sich bei der Ätiologie des Diabetes mellitus Typ 2 um eine Kombination aus einer polygenetischen Prädisposition und umweltbedingten Faktoren (z.B. Adipositas, energiereiche Ernährung, mangelnde Bewegung, Alter) (KAHN et al., 2003; ROSS et al., 2004). Er ist durch eine chronische Hyperglykämie charakterisiert, die durch Insulinresistenz und verminderte Insulinsekretion verursacht wird (KERNER et al., 2001). Durch die chronische Hyperglykämie kommt es zu Schädigungen des Gefäßsystems, welche sich als Folgeschäden im fortgeschrittenen Alter manifestieren und letztendlich zum Tode führen können.

Beim Gesunden bewirkt der Insulinstimulus über eine Signalkaskade die Translokation eines spezifischen Transporters (GLUT4) zur Plasmamembran, der die Aufnahme von Glukose in die Zelle ermöglicht. Es gilt als erwiesen, dass eine gestörte GLUT4-Translokation zu einer geringeren Aufnahme der Glukose in die Zelle und somit zur verminderten Wirkung von Insulin führt (Insulinresistenz).

Für den Transport von GLUT4 vom Inneren der Zelle zur Oberfläche ist ein intaktes Aktinfilament-Netzwerk notwendig (MARTIN et al., 1996; TSAKIRIDIS et al., 1997; OMATA et al., 2000; KANZAKI und PESSIN, 2001). Eine Beteiligung der Metaboliten der 12/15-Lipoxygenase -ein Enzym im Arachidonsäuremetabolismus- an der Bildung des Aktinfilament-Netzwerkes wurde in zahlreichen Untersuchungen nachgewiesen (KANG und VANDERHOEK, 1998; KANG et al., 1999).

DRANSFELD et al. stellten 2001 fest, dass eine Inhibition der 12/15-Lipoxygenase in Kardiomyozyten der Ratte eine Depolymerisation des Aktin-Netzwerkes und somit eine gestörte GLUT4-Translokation und Glukoseaufnahme hervorruft.

Ziel dieser Arbeit war es, den Einfluss der 12/15-Lipoxygenase auf die Insulinsignalkaskade und die GLUT4-Translokation anhand eines 12/15-Lipoxygenase-Knockout-Mausmodells näher zu charakterisieren. Weiterhin sollten die Knockout-Mäuse in Hinblick auf die Entwicklung einer Insulinresistenz untersucht werden.

## 2. SCHRIFTTUM

### 2.1 Diabetes mellitus

Laut Leitlinien der Deutschen Diabetes Gesellschaft (DDG) ist der Diabetes mellitus als eine durch den Leitbefund chronische Hyperglykämie hervorgerufene Regulationsstörung des Stoffwechsels charakterisiert. Es liegt entweder eine gestörte Insulinsekretion, eine verminderte Insulinwirkung oder beides zugrunde (KERNER et al., 2001). Von dieser multifaktoriellen Stoffwechselstörung sind weltweit zahlreiche Menschen betroffen (LENG et al., 2004). Dabei ist die Anzahl der Erkrankungen v.a. in den letzten zwei Jahrzehnten rapide gestiegen. Dies hängt u.a. mit der fortschreitenden Industrialisierung und den damit verbundenen veränderten Lebens- und Ernährungsbedingungen zusammen (ZIMMET et al., 2001; SHAW und CHISHOLM, 2003). In erster Linie ist hier die zu erwartende Zunahme der Adipositasfälle sowie eine steigende Lebenserwartung zu nennen. Zur Zeit sind weltweit schätzungsweise 150 Millionen Menschen an Diabetes mellitus erkrankt, Prognosen zufolge wird sich diese Zahl bis zum Jahre 2025 verdoppeln (ZIMMET et al., 2001).

Bisher ging man von einer Diabeteshäufigkeit in Deutschland von ca. 5 % der Bevölkerung aus. Aufgrund neuer epidemiologischer Studien, aus Vergleichen mit anderen Ländern und den neuesten Empfehlungen der World Health Organisation (WHO) und der International Diabetes Federation zur Diabetes-Diagnostik ist von einer Häufigkeit von 7-8 % der Erwachsenenbevölkerung auszugehen. Die Erfassung aller an Diabetes erkrankten Personen gestaltet sich schwierig, da gerade der am weitesten verbreitete Diabetes mellitus Typ 2 im Anfangsstadium ohne klinische Symptome verläuft. Daher wird vermutet, dass ca. 50 % der Diabetes mellitus Typ 2-Fälle nicht diagnostiziert werden. Der Anteil der Diabetes mellitus Typ 1-Patienten ist gering, er wird derzeit auf 5-7 % aller Diabetesfälle geschätzt (SHAW und CHISHOLM, 2003; GIANI et al., 2004). Sowohl Männer als auch Frauen sind mit etwa gleicher Häufigkeit von Diabetes betroffen, zwischen dem 40. und 60. Lebensjahr erkranken häufiger Männer als Frauen an Diabetes, ab dem 60. Lebensjahr kehrt sich das Verhältnis um (GIANI et al., 2004).

Gemäß American Diabetes Association (ADA) und WHO wurde der Diabetes mellitus 1997 aufgrund seiner Ätiologie klassifiziert (Tab. 1). Auf die Begriffe insulinabhängiger Diabetes mellitus (IDDM) und nicht-insulinabhängiger Diabetes mellitus (NIDDM) wurde ausdrücklich verzichtet, da bei dieser Bezeichnung nicht die zugrunde liegenden pathogenetischen Mechanismen berücksichtigt werden, sondern nur die jeweilige Therapieform (KUZUYA und MATSUDA, 1997).

Wie in Tab. 1 dargestellt ist, existieren zwei Hauptformen des Diabetes mellitus sowie zwei „Sonderformen“. Der Diabetes mellitus Typ 1 ist gekennzeichnet durch eine autoimmun-vermittelte Zerstörung der  $\beta$ -Zellen in den Langerhansschen Inseln des Pankreas. Dies führt zu einem Insulinmangel und damit zur Hyperglykämie mit den klassischen Symptomen: Polyurie, Polydipsie, Ketoazidose und Gewichtsverlust. Bei weiter anhaltender Hyperglykämie kann eine metabolische Azidose entstehen, die im fortgeschrittenen Stadium zum hyperglykämischen Koma führen kann. Menschen, die an Diabetes mellitus Typ 1 erkranken, sind, um zu überleben, auf exogene Insulingaben angewiesen (KERNER et al., 2001; BOITARD, 2002). In der Regel erkranken die meisten Patienten im Kindesalter, in den letzten Jahren wurde aber auch ein Anstieg der Neuerkrankungen bei Erwachsenen festgestellt. Diese Diabetes mellitus-Form wird als „verzögerter Typ 1-Diabetes im Erwachsenenalter“ (LADA) bezeichnet (KERNER et al., 2001; DEVENDRA et al., 2004). Die Ursachen der autoimmun-vermittelten Zerstörung sind bis jetzt nicht hinreichend geklärt, vermutlich ist ein Zusammenspiel genetischer und umweltbedingter Faktoren dafür verantwortlich (DEVENDRA et al., 2004). Neben dem immunologisch vermittelten Typ 1A Diabetes existiert noch ein weiterer Subtyp (Typ 1B), dem keine ätiopathogenetische Kausalität zuzuordnen ist. Es handelt sich um eine idiopathische Form, die im hohen Maße vererbbar ist und in Deutschland nur vereinzelt auftritt (KERNER et al., 2001; DEVENDRA et al., 2004).

Zu „Anderen spezifischen Typen“ gehören Diabetesformen, die sich aufgrund genetischer Defekte des Pankreas und der Insulinwirkung, endokriner oder anderer inter-nistischer Erkrankungen, als Medikamentennebenwirkungen, nach Infektionen, im Rahmen verschiedener Syndrome oder aufgrund immunologischer Prozesse entwickeln und äußerst selten vorkommen (KERNER et al., 2001).

Der Gestationsdiabetes ist definiert als Hyperglykämie, die erstmals während der Schwangerschaft festgestellt wird. Diese Diabetesform kommt in Deutschland bei ca. 6 % aller Schwangerschaften vor. Durch den Einfluss steigender Spiegel von Schwangerschaftshormonen (HPL, Prolaktin, Progesteron) kann es zu einer gestörten Glukose-Toleranz kommen. Prädisponierende Faktoren sind ein erhöhter Body-Mass-Index, Glukosurie und Diabetes mellitus Typ 1 bei Verwandten 1. Grades. Der Gestationsdiabetes bedeutet für Mutter und Kind ein hohes Risiko an Diabetes mellitus Typ 2 zu erkranken, welches durch frühzeitige Erkennung und konsequente Behandlung sowie langfristigen Kontrollen eingeschränkt werden kann (LINN und LANG, 2004).

Der Diabetes mellitus Typ 2 ist eine Erkrankung mit vielfältigen Ursachen. Nach heutigen Erkenntnissen handelt es sich um eine Kombination aus genetischer Prädisposition, wobei wahrscheinlich mehrere Gene beteiligt sind, und umweltbedingter Faktoren (z.B. Adipositas, energiereiche Ernährung, mangelnde Bewegung, Alter) (KAHN et al., 2003; ROSS et al., 2004). Versuche, die prädisponierenden Gene zu identifizieren, waren bislang wenig erfolgreich, da zahlreiche Mutationen in einer Vielzahl von Genen vermutet werden. Es gilt allerdings als erwiesen, dass die Genetik für die Entstehung eines Diabetes mellitus Typ 2 eine viel größere Rolle spielt als beim Typ 1. Das Risiko für die Nachkommen eines Typ 2-erkrankten Elternteils ebenfalls an Diabetes zu entwickeln, ist 3-6fach höher als bei Menschen, deren Eltern nicht erkrankt sind.

Durch den großen Einfluss der Lebensweise ist der Diabetes mellitus Typ 2 mittlerweile zu einer klassischen Erkrankung des sog. sedentären Lebensstils, kombiniert mit einer erhöhten energiereichen Ernährung, geworden (DOMINICZAK, 2003). Zahlreiche Untersuchungen haben eine Beteiligung der Adipositas an der Pathogenese der Insulinresistenz bewiesen. Dabei wurde festgestellt, dass besonders viszerales Fett bei androider Stammfettsucht eine hohe Neigung zur Adrenalin-induzierten Lipolyse hat (LAUBE, 2001). Durch eine verminderte Wirkung von Insulin auf die Antilipolyse und die vermehrte Lipolyse der Fettdepots ist bei insulinresistenten und übergewichtigen Personen die Blutkonzentration freier Fettsäuren erhöht.

Die freien Fettsäuren bewirken eine Steigerung der Glukoneogenese in der Leber und eine Hemmung der Glukoseaufnahme im Skelettmuskel. Somit wirken sie entgegen dem Insulineffekt und verstärken die Insulinresistenz. Weitere Sekretionsprodukte des Fettgewebes (Adiponectin, Tumor Nekrose Faktor  $\alpha$ , Leptin) stehen in Beziehung zur Entwicklung einer Insulinresistenz, wobei ihre Bedeutung noch unklar ist. Bewiesen hingegen ist die Beziehung zwischen Adipositas und Diabetes mellitus Typ 2. Mehrere prospektive Studien, die die Möglichkeit einer Verzögerung bzw. Verhinderung der Diabetes Typ 2-Neumanifestation durch Gewichtsreduktion belegen, erhärten diesen Befund (KNOWLER et al., 2002; CHIASSON et al., 2002). Durch Bewegungsmangel verändert sich die Expression von Elementen der Insulin-Signalkaskade; Glukosetransporter werden weniger gebildet und schwächer aktiviert. Multifaktorielle, oft gleichzeitig und interaktiv auftretende Ereignisse in verschiedenen Geweben erschweren eine homogene Darstellung der Pathogenese und Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2.



**I. Typ 1 Diabetes**

( $\beta$ -Zell-Zerstörung, die üblicherweise zum absoluten Insulinmangel führt)

A. Immunologisch vermittelt    B. Idiopathisch

**II. Typ 2 Diabetes**

(kann sich von einer vorwiegenden Insulinresistenz mit relativem Insulinmangel bis zu einem vorwiegend sekretorischen Defekt mit Insulinresistenz erstrecken)

**III. Andere spezifische Diabetes-Typen****A. Genetische Defekte der  $\beta$ -Zell-Funktion**

- Chromosom 20, HNF-4 $\alpha$  (frühere Bezeichnung MODY 1); Chromosom 12, HNF-1 $\alpha$  (frühere Bezeichnung MODY 3); Chromosom 7, Glukokinase (frühere Bezeichnung MODY 2); Mitochondriale DNA

**B. Genetische Defekte der Insulinwirkung**

- Typ A Insulinresistenz, Leprechaunismus, RABSON-MENDENHALL-Syndrom, Lipatrophischer Diabetes

**C. Erkrankungen des exokrinen Pankreas**

- Pankreatitis, Trauma, Pankreatektomie, Neoplasie, Zystische Fibrose, Hämochromatose, Fibrosierend-verkalkende Pankreopathie

**D. Endokrinopathien**

- Akromegalie, CUSHING-Syndrom, Glukagonom, Phäochromocytom, Hyperthyreose, Somatostatinom, Aldosteronom

**E. Medikamenten- oder chemikalieninduziert**

- Vacor, Pentamidin, Nikotinsäure, Glukokortikoide, Schilddrüsenhormone, Diazoxid,  $\beta$ -adrenerge Agonisten, Thiazide, Phenytoin, Alpha-Interferon

**F. Infektionen**

- Kongenitale Rötelninfektion, Zytomegalievirus

**G. Seltene Formen des immunvermittelten Diabetes, z.B.**

- „STIFF-PERSON“-Syndrom, Antiinsulinrezeptor-Antikörper

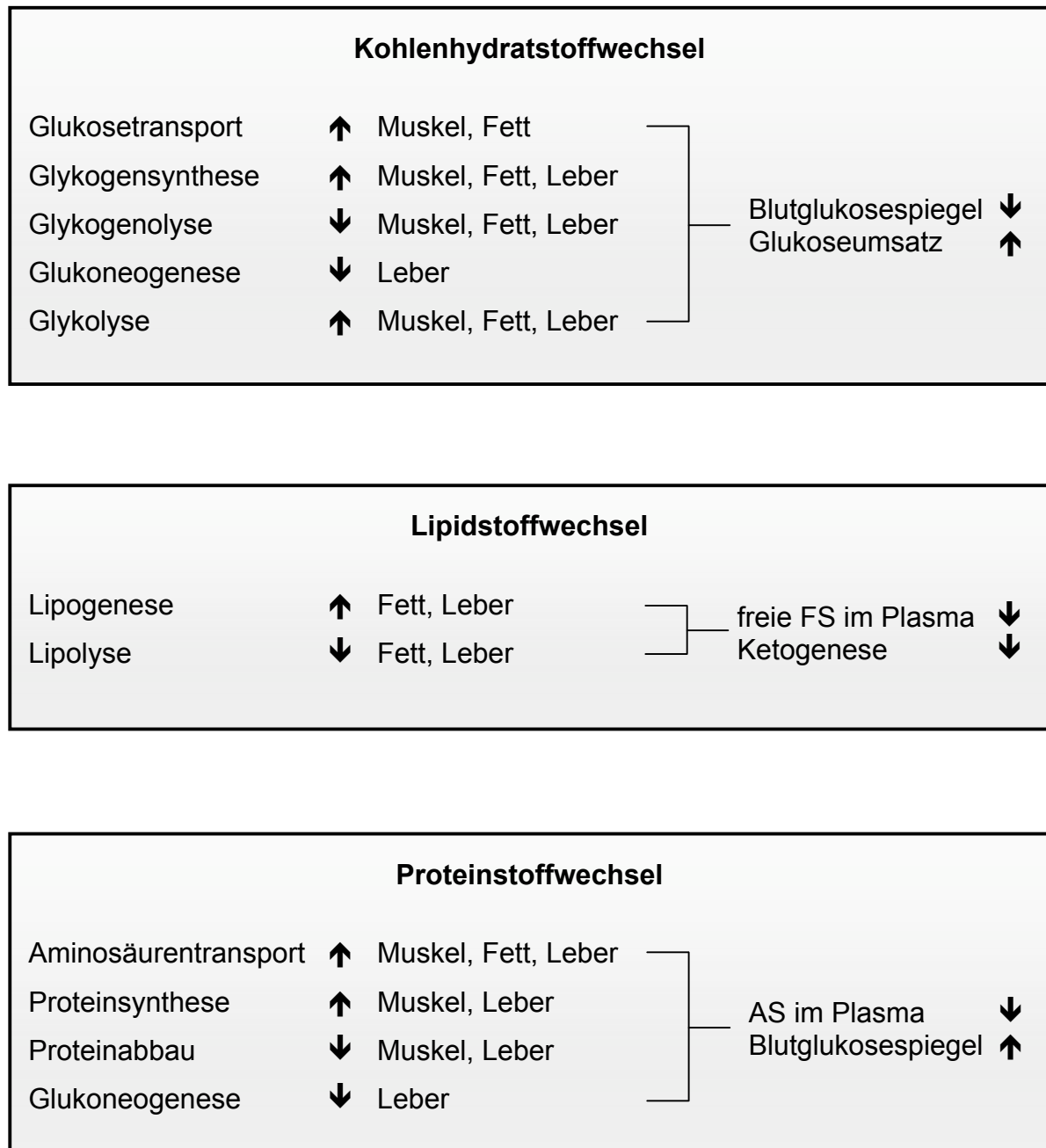
**H. Andere gelegentlich mit Diabetes assoziierte genetische Syndrome, z.B.**

- DOWN-Syndrom, KLINEFELTER-Syndrom, TURNER-Syndrom, WOLFRAM-Syndrom, FRIEDREICH-Ataxie, Porphyrie, PRADER-WILLI-Syndrom

**IV. Gestationsdiabetes**

**Tab. 1    Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus**  
(modifiziert nach ADA, 1997; ALBERTI und ZIMMET, 1998)

Im Zentrum der Regulierung der Glukosehomöostase steht das Pankreas, welches durch die Produktion und Sekretion der beiden Hormone Insulin und Glukagon für ein Gleichgewicht der Blutglukosekonzentration sorgt. Insulin, ein Peptidhormon, wird in den pankreatischen  $\beta$ -Zellen der Langerhansschen Inseln gebildet und reguliert den Kohlenhydrat-, Lipid- und Proteinstoffwechsel. Wichtigste Aufgabe ist die Suppression der hepatischen Glukoseproduktion durch Hemmung der Glykogenolyse und Glukoneogenese sowie die Steigerung der Aufnahme von Glukose in sog. „peripheren“ Geweben, wie Muskulatur und Fettgewebe. Die Wirkungen von Insulin sind in Abb.1 dargestellt. Sein Gegenspieler ist das von den  $\alpha$ -Zellen des Pankreas produzierte Peptidhormon Glukagon. Glukagon stimuliert im Postabsorptionszustand die Glukoseproduktion in der Leber, sowie die Glykogenolyse und die Glukoneogenese. Im Nüchternzustand ist die Insulinkonzentration eher niedrig und die Glukagonkonzentration relativ hoch. Nach einer Mahlzeit kommt es zu einem deutlichen Anstieg der Insulinkonzentration im Blut und somit zu den o.g. Wirkungen auf den Stoffwechsel. Durch Interaktion der beiden Hormone Insulin und Glukagon wird die notwendige Aufrechterhaltung der Blutglukosekonzentration innerhalb enger Grenzen (3,3 bis 10 mmol/l) gewährleistet. Voraussetzung für die hormonelle Kontrolle der Glukosehomöostase ist eine kontinuierliche Regulation der Blutglukosekonzentration. Die Glukose wird über einen spezifischen Glukosetransporter in die  $\beta$ -Zelle aufgenommen, von einer spezifischen Glukokinase phosphoryliert und in die Glykolyse eingeschleust. Über Veränderung von Ionenströmen, elektrischer Aktivität der  $\beta$ -Zelle und der Freisetzung und Modulation der intrazellulären Kalziumkonzentration kommt es letztendlich zur Exozytose insulinhaltiger Granula (STARKE, 2000). Diese Insulinsekretion verläuft beim Gesunden biphasisch. In der ersten Phase wird über ca. 10 min Insulin aus den Granula sezerniert, während in der 2. Phase, die nach ca. 20-30 min auftritt, neusynthetisiertes Insulin ausgeschüttet wird. Die 2. Phase hält so lange an, wie eine Hyperglykämie besteht (LAUBE, 2001; KELLERER et al., 2004). Es existieren zahlreiche Stimulatoren und Inhibitoren der Insulinsekretion, wobei allerdings die Blutglukosekonzentration den wichtigsten und entscheidenden Regulator darstellt (STARKE, 2000). Diese Regulation ist bei an Diabetes mellitus erkrankten Patienten gestört und verursacht somit ein Ungleichgewicht der Blutglukosehomöostase.



**Abb. 1** Insulinwirkungen auf den Stoffwechsel

(modifiziert nach THEWS et al., 1999)

↑ = Steigerung, ↓ = Hemmung

AS = Aminosäuren, FS = Fettsäuren

Bei den pathophysiologischen Vorgängen in der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 spielen drei Stoffwechselstörungen eine Rolle: die periphere Insulinresistenz, die hepatische Insulinresistenz und eine Störung der Insulinsekretion. Wie diese Störungen genau entstehen und interagieren, ist noch nicht eindeutig geklärt (CAVAGHAN et al., 2000; KADOWAKI, 2000; GOLDSTEIN, 2003). Nach heutigen Erkenntnissen ist die Insulinresistenz (verminderte Insulinwirkung) die erste Stoffwechselstörung, die 10-20 Jahre, bevor sich klinische Symptome zeigen, auftritt (SHULMAN, 2000; GOLDSTEIN, 2003).

Im Frühstadium des Diabetes mellitus Typ 2 entsteht durch die Insulinresistenz im Skelettmuskel eine Verminderung der Insulin-vermittelten Glukoseaufnahme und somit eine postprandiale Hyperglykämie. Da Insulin die Lipolyse im Fettgewebe hemmt (Abb. 2), führt die Insulinresistenz zu einer erhöhten Konzentration von freien Fettsäuren und Serumtriglyzeriden, die wiederum die hepatische Glukoneogenese stimulieren und die Aufnahme und Oxidation von Glukose hemmen. Erst im Stadium des manifesten Diabetes mellitus Typ 2 führt die hepatische Insulinresistenz zu einer gesteigerten Glukoneogenese und Störung der Glykogensynthese. Diese Störungen im Leberstoffwechsel resultieren in einer erhöhten Nüchternblutglukose, die ein diagnostisches Kriterium für den Diabetes mellitus Typ 2 darstellt.

Die Störungen der Insulinsekretion treten ebenfalls frühzeitig auf. Diese bestehen zunächst in einem Verlust der ersten Phase der Insulinsekretion nach einem Glukosestimulus. Der initiale Anstieg ist vermindert oder fehlt, es kommt lediglich zu einem langsamen, lang anhaltenden Anstieg des Insulinspiegels mit einem erhöhten und verlängerten Plateau der postprandialen Glukosekonzentration (KELLERER et al., 2004). Um diese Hyperglykämie auszugleichen, produziert das Pankreas vermehrt Insulin und es kommt zu einer Hyperinsulinämie (STARKE, 2000; GOLDSTEIN, 2003). Durch die erhöhte Insulinsekretion kann zunächst die fehlende Insulinwirkung im peripheren Gewebe und die erhöhte Glukoseproduktion in der Leber kompensiert werden. Allerdings verstärkt die Hyperinsulinämie auch die Insulinresistenz durch eine verminderte Stimulation der Insulinrezeptoren. Dies führt zur langsamen, aber progredienten Entwicklung einer Hyperglykämie, die erst ausschließlich postprandial vorhanden ist, im weiteren Verlauf aber auch im

Nüchternzustand auftritt (STARKE, 2000; GOLDSTEIN, 2003). Dadurch kommt es zu einer verminderten  $\beta$ -Zellfunktion bzw.  $\beta$ -Zell-„Erschöpfung“.

Klinische Symptome des Diabetes mellitus Typ 2 werden ausgeprägt, wenn die  $\beta$ -Zellen nicht mehr in der Lage sind, die fehlende Insulinwirkung zu kompensieren (STARKE, 2000; ROSS et al., 2004). Ursächlich ist wahrscheinlich eine Desensitivisierung der  $\beta$ -Zelle gegenüber dem Stimulus Glukose, wobei der genaue Mechanismus noch nicht bekannt ist (STARKE, 2000). Es wird vermutet, dass das natürliche Gleichgewicht zwischen Proliferation und Apoptose der  $\beta$ -Zellen beim Diabetes mellitus Typ 2 verändert ist und eine verminderte Neogenese in Verbindung mit einer erhöhten Apoptose-Rate zu einer Reduktion der  $\beta$ -Zellen führt. In kürzlich durchgeführten Studien an humanen  $\beta$ -Zellen konnte gezeigt werden, dass ein erhöhter Spiegel an freien Fettsäuren zur Apoptose der  $\beta$ -Zellen führen kann. Interessanterweise gilt dies vermutlich nur für gesättigte, jedoch nicht für ungesättigte Fettsäuren (EITEL et al., 2002; EITEL et al., 2003). Wenn Symptome fassbar werden, handelt es sich um die klassischen Folgen der Hyperglykämie wie Polyurie/Polydipsie, Muskelschwäche, Neigung zu Infektionen (insbesondere der Haut und Schleimhaut).

Der Begriff des metabolischen Syndroms beschreibt das gemeinsame Auftreten von Glukoseintoleranz oder Typ 2 Diabetes mit einer abdominellen Adipositas und/oder Dyslipoproteinämie und essentiellen arteriellen Hypertonie. (KERNER et al., 2001).

Ein wichtiger Aspekt des Diabetes mellitus sind die Spätschäden, die zahlreiche Organe (z.B. Niere, Auge, Nerven, Haut, Herz und Gehirn) betreffen können. Dabei handelt es sich in erste Linie um Veränderungen im Gefäßsystem, die sowohl in mikro- (z.B. Auge, Niere) als auch in makrovaskulären Gefäßen (z.B. Aorta, Koronararterien) auftreten (SCHLEICHER, 2004). Da in zahlreichen klinischen Studien gezeigt werden konnte, dass eine strikte Kontrolle des Blutglukosespiegels die Entstehung diabetischer Spätschäden deutlich verlangsamt, gilt die chronische Hyperglykämie als wichtigster Auslöser der Gefäßveränderungen (NAWROTH und BIERHAUS, 1999). Es existieren bislang verschiedene Hypothesen wie hyperglykämische Zustände Gefäßschäden auslösen können.

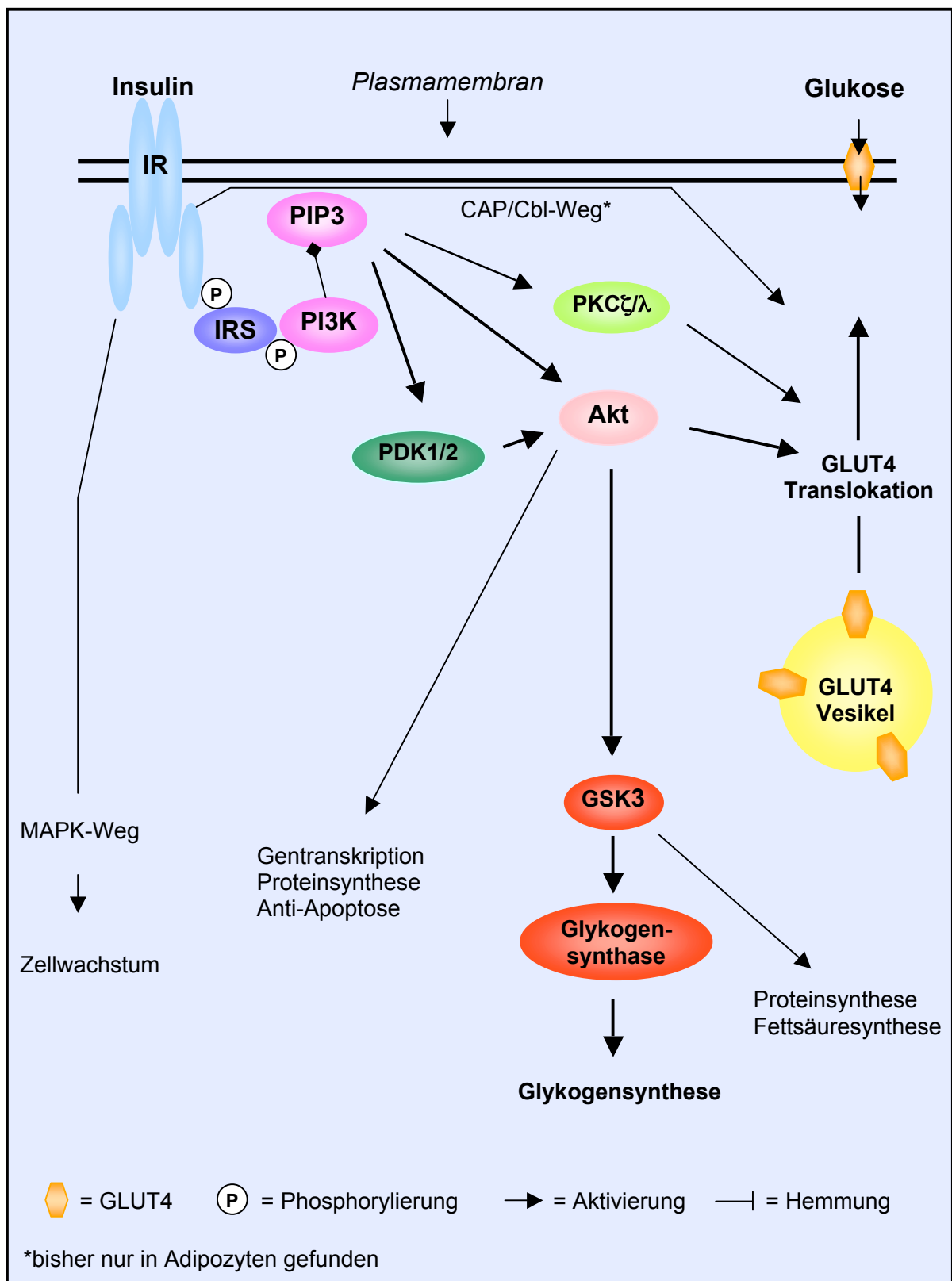
Es kommt zu einem Anstieg des *oxidativen Stress*, der durch reaktive Sauerstoffspezies Schäden an der Gefäßwand hervorruft. Dieser wird durch die Hyperglykämie selbst ausgelöst sowie indirekt durch die bei Hyperglykämie erhöhte Bildung von *Advanced Glycation End Products*. Weiterhin gibt es Hinweise für die Beteiligung der Proteinkinase C (PKC) sowie verschiedener Zytokine und Wachstumsfaktoren (z.B. Vascular endothelial Growth Factor, Transforming Growth Factor  $\beta$ ).

Diese Störungen des Stoffwechsels führen wie schon erwähnt zur diabetischen Mikro- bzw. Makroangiopathie. Die Gefäßläsionen an den großen und mittleren Arterien bei der Makroangiopathie weisen morphologisch keinen Unterschied zu der Atherosklerose bei Nichtdiabetikern auf (SCHLEICHER, 2004). Allerdings treten diabetesassoziierte, atherosklerotische Gefäßveränderungen in früherem Alter auf, zeigen rasche Progredienz und führen häufiger zu schweren Komplikationen wie Myokardinfarkt, Schlaganfall und diabetischen Fußsyndrom. Kardiovaskuläre Erkrankungen sind die Hauptursache für die hohe Morbidität und Mortalität bei Diabetikern, in allen Studien liegt die koronare Herzerkrankung an erster Stelle der Todesursachen (SAVAGE, 1996; MOORADIAN, 2003; SCHLEICHER, 2004).

Bei der diabetischen Mikroangiopathie hingegen handelt es sich um Diabetes-typische Veränderungen der Kapillaren. Von diesen Kapillarschädigungen sind häufig die Nieren betroffen. Durch die Veränderungen der Glomeruli entsteht eine Nephropathie, die im weiteren Verlauf zum terminalen Nierenversagen führt (ZIDEK, 2004). Ein weiteres Zielorgan der Mikroangiopathie ist das Auge. Die Diabetes-typischen Läsionen an den Retinakapillaren können im finalen Stadium zur Netzhautablösung und damit zur Erblindung führen. Bei einer über lange Zeit bestehender Diabeteserkrankung treten nahezu bei allen Patienten Schäden an der Netzhaut auf. In Deutschland wird die diabetische Retinopathie als häufigste Ursache für Erblindung bei Erwachsenen zwischen 20 und 74 Jahren angesehen (HAMMES, 2004). Zusätzliche Risikofaktoren, die bei diabetischen Patienten die Entwicklung von Folgeschäden beschleunigen, sind arterielle Hypertonie, Alkohol- und Nikotinkonsum, Hypercholesterolämie und Hypertriglyzeridämie (NAUCK, 2000).

## 2.2 Die Insulinsignalkaskade

Die Insulinsignalkaskade ist eine komplizierte Interaktion verschiedener Signalwege, die in Abb. 2 dargestellt sind. Der Insulinrezeptor kommt in praktisch allen Vertebraten-Geweben vor, wobei der Rezeptorbesatz stark variiert, von z.B. 40 Rezeptoren/Zelle in zirkulierenden Erythrozyten bis zu mehr als 200.000/Zelle in Adipozyten und Hepatozyten (WHITE, 1997). Es handelt sich um ein Membranprotein, bestehend aus je zwei  $\alpha$ - und  $\beta$ -Untereinheiten, die durch die Verknüpfung mit Disulfidbrücken einen heterotetrameren Komplex bilden (PESSIN und SALTIEL, 2000; KHAN und PESSIN, 2002). Die  $\alpha$ -Untereinheiten sind extrazellulär lokalisiert und stellen die Insulinbindungsstelle dar, während die  $\beta$ -Untereinheiten sowohl transmembranär als auch intrazellulär liegen (Abb. 2). Im intrazellulären Teil befindet sich eine katalytische Domäne mit einer Tyrosinkinase. Durch die Aktivierung der Tyrosinkinase leiten die  $\beta$ -Untereinheiten das Insulinsignal weiter (TAHA und KLIP, 1999). Dies führt zu einer intramolekularen Autophosphorylierung, bei der sich die  $\beta$ -Untereinheiten gegenseitig phosphorylieren. Die aktivierte Insulinrezeptor-Kinase phosphoryliert Proteine der Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS)-Familie (KHAN und PESSIN, 2002). Das erste Insulin-Rezeptor-Substrat (IRS1) wurde 1985 von WHITE et al. beschrieben. Mittlerweile wurden fünf weitere Substrate (IRS2-6) entdeckt (WHITE, 2003). Bei Untersuchungen mit transgenen Mäusen wurde festgestellt, dass der Hauptanteil der Insulinantwort über IRS1 und IRS2 vermittelt wird (TAMEMOTO et al., 1994; ARAKI et al., 1994; WITHERS et al., 1998). IRS1 vermittelt die periphere Insulinantwort und ist an der Kontrolle des Körperwachstums beteiligt, während IRS2 die Glukosehomöostase sowie die Gehirnentwicklung und die weibliche Fertilität reguliert (WHITE, 2003).



**Abb.2 Insulinsignalkaskade**

(modifiziert nach LENG et al., 2004; VOLLENWEIDER, 2003)



Die Phosphorylierung der Insulinrezeptorsubstrate an spezifischen Tyrosin-Resten schafft Erkennungsstellen für Proteine mit charakteristischen Bindungsdomänen (HOLMAN und KASUGA, 1997; KHAN und PESSIN, 2002; VOLLENWEIDER, 2003). Zu diesen Proteinen gehören Enzyme wie die Lipidkinase Phosphatidylinositol-3'-Kinase (PI3K) sowie zahlreiche Adapter-Proteine: GRB-2, NCK, CRK, SHB u.a. (VIRKAMÄKI et al., 1999; WHITE, 2004). Ein wichtiges Element in der Insulin-Signalkaskade, insbesondere für die GLUT4-Translokation, ist die PI3K (VIRKAMÄKI et al., 1999; SALTIEL und PESSIN, 2000; VOLLENWEIDER, 2003). Durch Inhibierung der PI3K wird die Insulin-stimulierte Translokation der Glukosetransporter (siehe 2.3) und die Glukoseaufnahme gehemmt (KHAN und PESSIN, 2002). Die PI3K ist ein Heterodimer, welches aus einer regulatorischen p85-Untereinheit und einer katalytischen p110-Untereinheit besteht (TAHA und KLIP, 1999). Es existieren mehrere Isoformen der regulatorischen Untereinheit (p85 $\alpha$ , p85 $\beta$ , p55<sup>PIK</sup>, p55 $\alpha$ , p50 $\alpha$ ) und drei Isoformen der katalytischen Untereinheit (p110 $\alpha$ , p110 $\beta$ , p110 $\delta$ ) (VANHAESEBROECK et al., 1997).

Die regulatorische Untereinheit der PI3K bindet an IRS1 bzw. IRS2 und führt somit zur Translokation der katalytischen Untereinheit zur Plasmamembran, wo sie die Phosphorylierung von Phosphoinositol an der 3'-Hydroxylgruppe katalysiert (FRAUMAN et al., 1998). Die PI3K katalysiert dabei die Bildung von PI(3,4,5)-triphosphat (PIP3) aus PI(4,5)-biphosphat und die Bildung von PI(3,4)-biphosphat aus PI(4)-monophosphat. Dies wiederum aktiviert Proteine, die eine Pleckstrin-homologe (PH) Domäne besitzen, wie die 3'-Phosphoinositol-abhängigen-Kinasen PDK1 und PDK2. PDK1 aktiviert auf direktem Wege nachfolgend agierende Mediatoren wie die Serin-Threonin-Kinase Akt (früher auch als Proteinkinase B bezeichnet) und die Isoformen der atypischen Protein Kinase C (aPKC) (KELLERER et al., 1998; VOLLENWEIDER, 2003; LENG et al., 2004). Akt spielt eine wichtige Rolle für die GLUT4-Translokation (KOHN et al., 1996) und die Glykogensynthese (UEKI et al., 1998). Es sind zurzeit drei verschiedene Isoformen (Akt1, Akt2, Akt3) mit einem Molekulargewicht von 57 kDa bekannt, die alle eine N-terminale PH Domäne, eine Kinase-Domäne und eine C-terminale regulatorische Domäne besitzen (VANHAESEBROECK und ALESSI, 2000).

Akt1 und Akt2 werden in verschiedenen Geweben exprimiert, am stärksten in Gehirn, Thymus, Herz und Lunge. Das Vorkommen von Akt 3 ist begrenzter, stärker in Hoden und Gehirn, weniger in Herz, Milz, Lunge und Skelettmuskel (COFFER et al., 1998). Die für die GLUT4-Translokation bedeutsamen Isoformen sind Akt1 und Akt2, wobei erstere vorwiegend im Skelettmuskel vorkommt, während letztere in den Adipozyten dominiert (WALKER et al., 1998; HAJDUCH et al., 2001). Alle drei Akt-Isoformen werden durch die Bindung von Insulin an den Rezeptor stimuliert. Die Aktivierung geschieht in zwei Schritten. Zunächst erfährt Akt eine Konformationsänderung durch die Bindung von PIP3 an die PH-Domäne. Darauf folgend wird das Enzym über das Zytoskelett (s.u.) zur Plasmamembran transportiert und dort phosphoryliert (HAJDUCH et al., 2001; LAWLOR und ALESSI, 2001). Die Phosphorylierung der Akt ereignet sich an zwei verschiedenen Stellen: Thr<sup>308</sup> (Kinase-Domäne) und Ser<sup>473</sup> (regulatorische Domäne) (HAJDUCH et al., 2001).

Die Bedeutung von Akt in der Insulinsignaltransduktion und in der Entwicklung einer Insulinresistenz ist noch nicht eindeutig geklärt. Es gibt Studien, die eine gestörte Akt-Aktivierung in isolierten Adipozyten aus diabetischen Ratten (CARVALHO et al., 1997) bzw. Mäusen (SHAO et al., 2000) und Menschen sowie in Skelettmuskeln von hyperglykämischen Ratten belegen (KROOK et al., 1997; KROOK et al., 1998; KUROWSKI et al., 1999). Im Gegensatz dazu existieren aber auch Daten, die keine signifikante Veränderung der Phosphorylierung der Akt in Adipozyten von diabetischen Ratten (KANO et al., 2000) oder im Skelettmuskel von diabetischen Menschen (KIM et al., 1999) zeigen. Untersuchungen von CHO et al. (2001) geben Hinweise auf die Beteiligung der Akt2 an der Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase. Akt2-defiziente Mäuse zeigten Symptome einer Insulinresistenz wie Hyperglykämie und einen erhöhten Serum-Insulinspiegel. Es ist daher anzunehmen, dass die verschiedenen Akt-Isoformen auch verschiedene Substrate phosphorylieren. Dies wurde auch 2003 durch BROZINICK et al. bestätigt, der in insulinresistenten humanen Skelettmuskeln eine Aktivität von Akt1, aber nicht von Akt2 oder Akt3 nachweisen konnte.

Eine Beteiligung der Akt1 an der Stimulation des Glukosetransportes durch Insulin in Muskelzellen wurde 1999 festgestellt. 2002 beschrieben KANE et al. das Protein AS160 in Adipozyten, welches durch Akt phosphoryliert wird. Es besitzt eine Domäne mit GTPase-Aktivität für Rab-Proteine, die notwendig sind für den Transport zur Plasmamembran. Außerdem wurde festgestellt, dass AS160 die GLUT4-Translokation in Adipozyten reguliert und somit eine direkte Verbindung zwischen Akt und GLUT4 darstellt (SANO et al., 2003).

Eines der wichtigsten Zielproteine der Akt ist die Glykogen-Synthase-Kinase (GSK3). Die GSK3 ist eine Serin/Threonin-Protein-Kinase, die die Glykogensynthese hemmt. Außerdem ist sie an der Kontrolle zahlreicher zellulärer Prozesse wie der Glykogen- und Proteinsynthese, der Tumorgenese und der Zellvitalität beteiligt. Im Basalzustand ist die GSK3 aktiviert und führt durch die Phosphorylierung zur Inhibition der Glykogensynthese. Durch Insulin wird die GSK3 inaktiviert und führt somit zur Aktivierung der Glykogensynthese und dadurch zu einer erhöhten Glykogensynthese (HAJDUCH et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002; DOBLE und WOODGETT, 2003). In Skelettmuskelzellen von Diabetes mellitus Typ 2 Patienten ist sowohl der GSK3-Proteingehalt als auch die Aktivität erhöht (NIKOULINA et al., 2000). Es existieren zwei Isoformen der GSK3: GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$ , die eine 97 %ige Homologie zwischen ihren katalytischen Domänen aufweisen, sich aber außerhalb dieser Region signifikant unterscheiden (FRAME und COHEN, 2001). Die GSK3 $\alpha$  besitzt ein Molekulargewicht von 51 kDa, die GSK3 $\beta$  von 47 kDa (ADNAN et al., 2001). Die Hemmung der GSK3 durch Akt geschieht über die Phosphorylierung an den N-terminalen Serin-Resten Ser<sup>21</sup> (GSK3 $\alpha$ ) bzw. Ser<sup>9</sup> (GSK3 $\beta$ ). GSK3 kann allerdings auch durch Wachstumsfaktoren über dem MAPK-Weg gehemmt werden (ADNAN et al., 2001; FRAME und COHEN, 2001).

Eine Alternative zum Akt-Signalweg ist die Aktivierung der atypischen PKC-Isoformen PKC- $\lambda$  und PKC- $\zeta$  (siehe Abb.2), die ebenfalls durch Insulin PI3K-abhängig aktiviert werden (KHAN und PESSIN, 2002). Die Rolle dieser Kinasen ist noch nicht eindeutig geklärt (VOLLENWEIDER, 2003).

Eine weitere Möglichkeit der Weiterleitung des Insulinsignals ist der mitogen-aktivierte Proteinkinase (MAPK)-vermittelte Signalweg (Abb.2). Über mehrere Phosphorylierungsschritte wird MAPK, ein Schlüsselenzym in der Regulation der Genexpression und Proliferation, aktiviert. Für die GLUT4-Translokation ist dieser Weg von geringer Bedeutung (TAHA und KLIP, 1999; VIRKAMÄKI et al., 1999). Es gibt Hinweise für die Existenz eines PI3K-unabhängigen Signalweges, der von der Zellmembran ausgeht und über Cb-assoziiertes Protein (CAP) und verschiedene Adapterproteine letztendlich zur Aktivierung des G-Proteins TC10 führt (Abb. 2). Es wird vermutet, dass TC10 die Umbildung der Aktinfilamente bewirkt bzw. die Aktinpolymerisation stimuliert und damit die GLUT4-Translokation fördert (KAHN und PESSIN, 2002). Die physiologische Rolle dieses Weges ist bis jetzt noch nicht geklärt (VOLLENWEIDER, 2003).

## 2.3 GLUT4-Translokation und Zytoskelett

Unter insulinstimulierten Bedingungen findet der größte Teil der Glukoseaufnahme im Skelettmuskel statt (KOISTINEN und ZIERATH, 2002). Dieser Mechanismus ist bei Patienten mit Diabetes mellitus Typ 2 gestört (DE FRONZO et al., 1985; SHULMAN et al., 1990; ERIKSSON et al., 1992). Die Glukoseaufnahme erfolgt mit Hilfe der Glukosetransporter (GOODYEAR et al., 1996). Es existieren zwei verschiedene Gruppen von Transportern: der in Niere und Dünndarm vorkommende  $\text{Na}^+$ -abhängige Glukose-Co-Transporter SGLT, der entgegen des Konzentrationsgefälles unter Energieverbrauch transportiert, und die  $\text{Na}^+$ -unabhängigen Glukosetransporter GLUT (WOOD und TRAYHURN, 2003). Im Gegensatz zu den SGLT sind die GLUT in nahezu jedem Gewebe vorhanden und transportieren Glukose über erleichterte Diffusion (ZIERLER, 1999). Die Familie der GLUT-Transporter umschließt mittlerweile 13 Mitglieder (GLUT1-12 und HMIT), die sich hinsichtlich ihrer Gewebeverteilung und intrazellulären Lokalisation sowie ihrer kinetischen Eigenschaften unterscheiden (BRYANT et al., 2002; WOOD und TRAYHURN, 2003). Aufgrund ihrer strukturellen Verwandtschaft werden sie in drei Klassen eingeteilt: Zur Klasse I gehören GLUT1-4,

Klasse II beinhaltet GLUT5, GLUT7, GLUT9 und GLUT11, der Klasse III gehören GLUT6, GLUT8, GLUT10, GLUT12 und HMIT an. Die unterschiedliche Lokalisation der Transporter ist in Tab. 2 dargestellt. Auch hinsichtlich ihrer Affinität zu Glukose unterscheiden sich die einzelnen GLUT-Transporter-Proteine, während z.B. GLUT3 und GLUT4 hochaffin sind, haben GLUT2, GLUT5 und GLUT11 eine niedrige Affinität und können zusätzlich auch Fruktose transportieren. GLUT2 ist im Pankreas vorhanden und vermittelt dort die Glukoseaufnahme in die  $\beta$ -Zelle. Die ubiquitär exprimierte Isoform GLUT1 ist bereits im Basalzustand verstärkt in der Plasmamembran lokalisiert und ist verantwortlich für die Aufrechterhaltung der zellulären Grundversorgung mit Glukose (MUECKLER, 1994; KHAN und PESSIN, 2002; RUDICH und KLIP, 2003). Die Isoform GLUT4 hat ein Molekulargewicht von 45kDa und kommt vorwiegend in insulinsensitiven Geweben wie Muskulatur und Fett vor. Dort vermittelt sie neben GLUT1 den basalen sowie den insulinstimulierten Glukosetransport in die Zelle (CZECH et al., 1999; HOLMAN und SANDOVAL, 2001; RUDICH und KLIP, 2003). Die gestörte GLUT4-Translokation ist ein charakteristisches Merkmal der Insulinresistenz und des Diabetes mellitus Typ 2 (GARVEY et al., 1998; GALUSKA et al., 1998).

<b>Isoform</b>	<b>Lokalisation</b>	<b>Erstbeschreibung</b>
GLUT1	ubiquitär	(MUECKLER et al., 1985; GOULD et al., 1991)
GLUT2	Leber, Pankreas, Darm, Niere	(FUKUMOTO et al., 1988; GOULD et al., 1991)
GLUT3	Gehirn	(KAYANO et al., 1988; GOULD et al., 1991)
GLUT4	Herz, Muskel, Weißes und Braunes Fettgewebe, Hirn	(FUKUMOTO et al., 1988; JAMES et al., 1989)
GLUT5	Darm, Hoden, Niere	(KAYANO et al., 1990; DAVIDSON et al., 1992)
GLUT6	Gehirn, Milz, Leukozyten	(DOEGE et al., 2000a; LISINSKI et al., 2001)
GLUT7	<i>Nicht bekannt</i>	(JOOST und THORENS, 2001)
GLUT8	Hoden, Gehirn	(CARAYANNOPOULOS et al., 2000; DOEGE et al., 2000b; IBBERSON et al., 2000; LISINSKI et al., 2001)
GLUT9	Leber, Niere	(PHAY et al., 2000)
GLUT10	Leber, Pankreas	(DAWSON et al., 2001; McVIE-WYLIE et al., 2001)
GLUT11	Herz, Muskel	(DOEGE et al., 2001; WU et al., 2002; SASAKI et al., 2001)
GLUT12	Herz, Prostata, Muskel, Weißes Fettgewebe	(ROGERS et al., 2002)
HMIT	Gehirn	(ULDRY et al., 2001)

**Tab. 2 Klassifizierung der Glukose-Transporter (GLUT)-Familie**  
(modifiziert nach WOOD und TRAYHURN, 2003)

Im Basalzustand befindet sich GLUT4 zum Großteil in verschiedenen intrazellulären Kompartimenten (CUSHMAN und WARDZALA, 1980; SUZUKI und KONO, 1980; HOLMAN und KASUGA, 1997; BRYANT et al., 2002). Er ist überwiegend in Vesikeln (z.B. Endosomen, Clathrin-enhaltende Vesikel) und tubulovesikulären Strukturen (trans-Golgi-Netzwerk) lokalisiert (HOLMAN und SANDOVAL, 2001). Es ist bekannt, dass die Translokation von GLUT4 zur Plasmamembran und ins Zellinnere zurück über ein endosomales Membran-Recyclingsystem geschieht (PESSIN et al., 1999) (Abb. 3). Durch Insulinstimulation kommt es zu einer erhöhten Akkumulation von GLUT4 an der Plasmamembran. Dadurch erhöht sich die Exozytoserate um das 10-20fache, die Endozytose reduziert sich um das 2-3fache (ELMENDORF, 2002). Es ist noch nicht detailliert bekannt, wie Insulin den Transport von GLUT4 zur Plasmamembran induziert. In zahlreichen Untersuchungen konnte eine Beteiligung des Aktinzytoskeletts bei der Insulin-stimulierten Translokation des Glukosetransporters GLUT4 gezeigt werden (TSAKIRIDIS et al., 1994; WANG et al., 1998a; TONG et al., 2001).

Die Funktionen des Zytoskeletts sind sehr vielfältig. Es ermöglicht der Zelle durch Polymerisation ihre Form und Gestalt zu kontrollieren, sich zu teilen, fortzubewegen, zu sezernieren, zu phagozytieren und schafft Wege für den intrazellulären Transport (SMALL et al., 1999; CARPENTER, 2000). Das Zytoskelett besteht aus einer Ansammlung von Fasern, die sich in drei Kategorien klassifizieren lassen: Mikrofilamente, Intermediärfilamente und Mikrotubuli. Die Mikrofilamente, aufgebaut aus Aktinuntereinheiten, bilden das Aktinzytoskelett (LODISH et al., 2001). Das Aktinzytoskelett ist an der Regulation zahlreicher endo- und exozytotischer Vesikeltransportprozesse beteiligt, wobei die Mechanismen der Vesikelbindung an die Aktinfilamente noch unklar sind (VALENTIJN et al., 1999; QUALMANN, et al. 2000; ROGERS und GELFAND, 2000).

Es existieren drei Aktin-Isoformen:  $\alpha$ -Aktin in Muskelzellen sowie  $\beta$ - und  $\gamma$ -Aktin in nichtmuskulären Zellen. Aktin kann in monomerer Form als G-Aktin in der Zelle vorliegen oder in filamentöser Form als F-Aktin, welches aus G-Aktinuntereinheiten besteht (CHEN et al., 2000; CARPENTER, 2000). Die Fähigkeit von G-Aktin zur Polymerisation in F-Aktin und zur Depolymerisation unter Rückbildung von G-Aktin zählt

zu den wichtigsten Eigenschaften des Aktinmoleküls. Daten aus *in vitro*-Versuchen zeigen eine Polymerisation in drei Phasen. In der Keimbildungsphase werden kurze, instabile Oligomere aus G-Aktinmonomeren gebildet. Ab einer Länge von 3-4 Untereinheiten dienen sie als Anlagerungsstellen für weitere Monomere, um die Kette zu verlängern (Verlängerungsphase). Die dabei entstandene Kette wird bis zur Erreichung des Fließgleichgewichtes der Konzentrationen von Aktinfilamenten und G-Aktin verlängert. In dieser Phase werden G-Aktinmonomere nur noch ausgetauscht, eine Erweiterung findet nicht mehr statt. Die Regulation der Polymerisation erfolgt über akzessorisch aktinbindende Proteine. Thymosin  $\beta_4$  verhindert durch seine Bindung an G-Aktin eine Anlagerung an das Aktinfilament. Profilin hingegen fördert die Polymerisation durch Unterstützung der Bindung von Monomeren an Aktinfilamente. Weiterhin spielt es möglicherweise eine Rolle beim Aufbau der Aktinfilamente an der Plasmamembran.

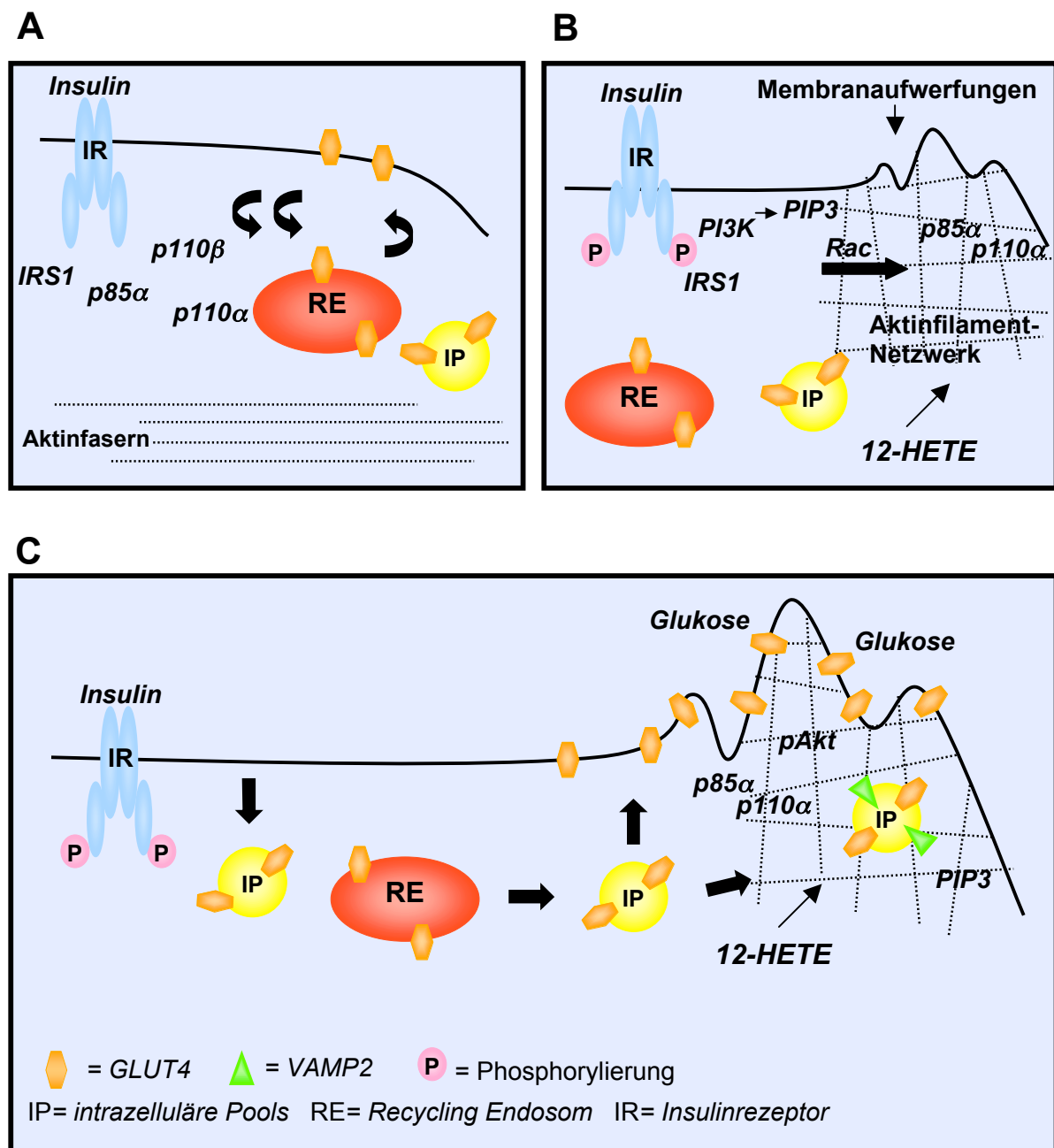
Die Aktinfilamente sind zum größten Teil als Bündel und Netzwerk angeordnet, die dadurch zur Stabilisierung der Zelle beitragen (Aktinzytoskelett). Im Bündel sind die Aktinfilamente parallel gelagert, während sie sich bei der Netzwerk-Konformation überkreuzen und weniger dicht angeordnet sind. Das direkt unter der Plasmamembran liegende Netzwerk ist zweidimensional, das im Zellinneren gelegene ist dagegen dreidimensional aufgebaut. Bei allen Anordnungen sind die Aktinfilamente durch quervernetzende Proteine miteinander verbunden (LODISH et al., 2001). Der Vesikeltransport über Aktinfilamente wird über das mechanochemische Enzym Myosin vermittelt (BUSS et al., 2002). Myosin ist eine ATPase und wandelt die bei der ATP-Hydrolyse entstandene chemische Energie in mechanische Energie um (LODISH et al., 2001). Bisher wurden 18 verschiedene Myosinklassen entdeckt, die unterschiedliche Funktionen besitzen. Vermutlich sind Myosin I, V und VI am intrazellulären Vesikeltransport beteiligt (LODISH et al., 2001; BUSS et al., 2002).



TSAKIRIDIS et al. erkannten 1994, dass die Depolarisation (verursacht durch Cytochalasin D) des Aktinfilament-Netzwerkes zu einer Konformationsänderung führt und somit den insulinabhängigen Glukosetransport hemmt. Weitere Arbeiten bestätigen die Beteiligung des Aktinzytoskeletts an der GLUT4-Translokation in Adipozyten und Muskelzellen (MARTIN et al., 1996; TSAKIRIDIS et al., 1997; OMATA et al., 2000; KANZAKI und PESSIN, 2001). WANG et al. (1998) zeigte an 3T3-L1-Adipozyten, dass das Aktinfilament-Netzwerk nur an der Insulin-induzierten Translokation und nicht am Recycling der Transporter beteiligt ist. Im Basalzustand war unter Behandlung mit Cytochalasin D keine Änderung des GLUT4-Gehaltes an der Zelloberfläche erkennbar.

Wie in Abb. 3 Bild A dargestellt ist, sind die Aktinfilamente im Basalzustand als gespannte Fasern angeordnet, GLUT4 befindet sich dabei in intrazellulären Pools. Durch die Insulinstimulation werden verschiedene Signalkaskaden (Bild B) ausgelöst (Abb. 2.2), es kommt u.a. zu einem Anstieg von PI(3,4,5)-triphosphat. Dies ist für die Umbildung der Aktinfilamente an der Plasmamembran notwendig (KHAYAT et al., 2000; PATEL et al., 2003). An der Bildung des Aktinfilament-Netzwerkes und an den Veränderungen der Plasmamembran ist auch die GTPase Rac beteiligt (RIDLEY et al. 1992). Die Aktinfilamente bilden ein maschenartiges Netzwerk, welches zu faltenförmigen Membranaufwerfungen führt (TONG et al., 2001). In diesem Netzwerk wurden die regulatorische p85 $\alpha$ - und p110 $\alpha$ -Untereinheit der PI3K sowie die aktivierte Akt lokalisiert (PATEL et al., 2003). Dies ist ein Hinweis darauf, dass das Aktinfilament-Netzwerk auch für bestimmte Insulinsignalmoleküle, die an der GLUT4-Translokation beteiligt sind, als ein „Gerüst“ dient. Verschiedene Arbeiten belegen die Notwendigkeit eines intakten Aktinzytoskeletts für den Transport der Akt zur Plasmamembran, wo sie phosphoryliert wird. Die GLUT4-enthaltenden Vesikel wandern über das Aktinfilament-Netzwerk zur Plasmamembran. Mit Hilfe der SNARE-Proteine (**s**oluble **N**-ethylmaleimide sensitive factor **a**ttachment protein **r**eceptor) fusionieren sie mit der Plasmamembran und können so Glukose aufnehmen und ins Innere der Zelle transportieren (RUDICH und KLIP, 2003).

Es wurden drei SNARE-Proteine, die an der Fusion der GLUT4-Vesikel mit der Plasmamembran beteiligt sind, identifiziert. (BRYANT et al., 2002; ELMENDORF, 2002). SNARE-Proteine gehören zu einer Gruppe von membranbindenden Proteinen, die an Fusionsprozessen beteiligt sind und hinsichtlich ihrer Lokalisation in v-SNARE (vesicle) und t-SNARE (target) unterteilt werden (BRYANT et al., 2002). V-SNARE-Proteine befinden sich in den GLUT4-Vesikeln, gelangen nach der Depolarisation der Vesikelhülle an die Oberfläche und bilden mit t-SNARE-Proteinen einen Komplex an der Plasmamembran (ELMENDORF, 2002; BRYANT et al., 2002; TONG et al., 2001). Der genaue Prozess ist bislang noch nicht bekannt. Die GTPase Rab4, welche in den GLUT4-Vesikeln kolokalisiert ist, vermittelt die Bindung zwischen VAMP2 (t-SNARE) und der Zielmembran (PESSIN et al., 1999; ZERIAL und McBRIDE, 2001). Obwohl es auch Hinweise auf die Beteiligung der Mikrotubuli an der GLUT4-Translokation gibt (FLETCHER et al., 2000) gilt es mittlerweile als erwiesen, dass ein intaktes Aktinzytoskelett essentiell für die Insulin-induzierte Glukoseaufnahme ist.



**Abb. 3 Modell für die Insulin-stimulierte GLUT4-Translokation in Skelettmuskelzellen (modifiziert nach RUDICH und KLIP, 2003)**

**A:** Im Basalzustand sind die Aktinfilamente hauptsächlich als gespannte Fasern parallel angeordnet. Die GLUT4-Vesikel recyceln zwischen Plasmamembran und vesikulären Pools, sind aber zum größten Teil im Inneren der Zelle lokalisiert.

**B:** Nach Insulinstimulation kommt es zur Umbildung der Aktinfilamente und zu faltenförmigen Aufwerfungen der Plasmamembran. Für die Ausbildung des Aktingerüsts ist die Aktivierung der PI3K zu PIP3 unter Beteiligung der GTPase Rac notwendig

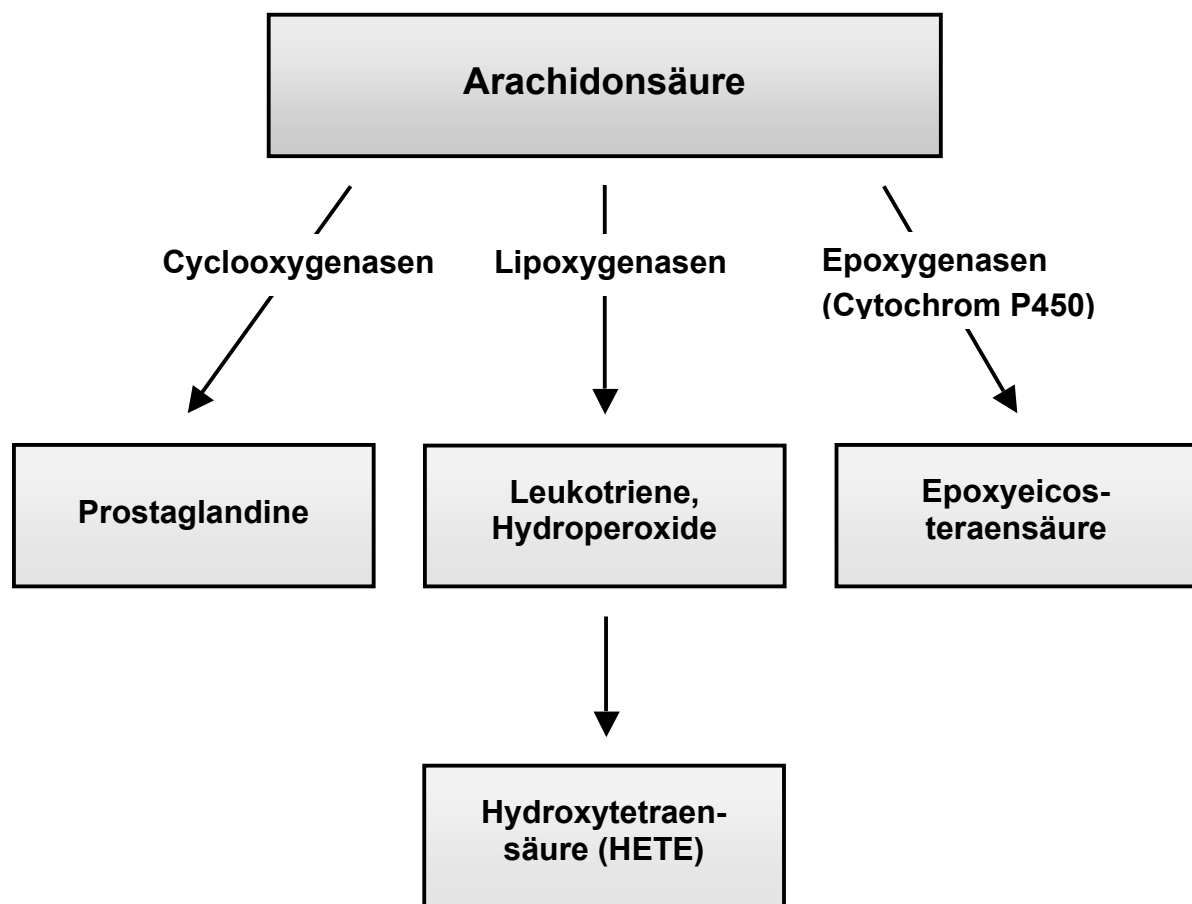
**C:** PIP3, p85 $\alpha$ , p110 $\alpha$  und pAkt nutzen das Aktinfilament-Netzwerk als Gerüst. Die GLUT4 Vesikel erreichen über das Aktinfilament-Netzwerk die Plasmamembran. Dort findet die Fusion mit Hilfe der VAMP2 statt.

## 2.4 Lipoxygenasen

Die Lipoxygenasen gehören zu einer Familie von Enzymen, die weit verbreitet in Pflanzen, Pilzen, Tieren und in den meisten Bakterien vorkommt, aber in Viren nicht vorhanden ist (BRASH, 1999; KUHN und THIELE, 1999; PRATICÓ et al., 2004). 1974 wurde das Enzym von HAMBERG und SAMUELSSON erstmals aus humanen Thrombozyten isoliert. Seitdem wurden zahlreiche verschiedene Isoformen entdeckt. Die Lipoxygenase ist eine Dioxygenase mit einem Molekulargewicht von ca. 75-80 kDa und katalysiert den Einbau von molekularem Sauerstoff in mehrfach ungesättigte Fettsäuren wie Arachidonsäure bzw. Linolsäure (FUNK et al., 1996; BRASH, 1999; SUN et al., 1999; PRATICÓ et al., 2004). Die Enzymnomenklatur richtet sich nach der Stelle des Substrates, an der Sauerstoff eingebaut wird, dementsprechend werden sie als 5-, 8-, 12-, und 15-Lipoxygenase bezeichnet (YAMAMOTO et al., 1997).

Die zahlreichen Effekte der Lipoxygenasen sind bis zum heutigen Zeitpunkt noch nicht eindeutig geklärt. Bewiesen ist, dass sie in den Arachidonsäuremetabolismus involviert sind (KUHN und THIELE, 1999). Die Arachidonsäure ist die zentrale Vorstufe der Eicosanoide und bildet diese über eine Reaktion mit molekularem Sauerstoff mittels dreier unterschiedlicher Stoffwechselwege (Abb. 4) (NIE et al., 2000; FUNK, 2001; DING et al., 2003).

Durch die 5-, 8-, 12- oder 15-Lipoxygenase entstehen aus Arachidonsäure die Primärprodukte 5-, 8-, 12- bzw. 15-Hydroxyperoxysäure (HPETEs), die unmittelbar durch die Glutathion-Peroxidase in Hydroxyeicosatetraensäuren umgewandelt werden (HETEs) (Abb. 4). Da mehrere Formen der 12/15-Lipoxygenase existieren, wurden sie nach dem Gewebe bzw. Zelltyp, in dem sie überwiegend exprimiert werden, benannt (Plättchentyp, Leukozytentyp, epidermaler Typ) (FUNK, 1996; BRASH, 1999; DING et al., 2003). Diese verschiedenen Typen unterscheiden sich hinsichtlich ihrer Lokalisation, Substratspezifität, Immunogenität und Sequenzhomologie.



**Abb. 4 Arachidonsäuremetabolismus**  
(modifiziert nach ZELDIN, 2001)

Im Unterschied zum Plättchentyp hat der Leukozytentyp die Fähigkeit, nicht nur 12-HETEs, sondern auch 15-HETEs, zu bilden (Verhältnis 3:1). Aufgrund dieser Tatsache wird sie auch als 12/15-Lipoxygenase bezeichnet (PRATICÓ et al., 2004). Das Vorkommen dieser Isoform wurde in verschiedenen Geweben von Säugetieren beschrieben (FREIRE-MOAR et al., 1995; BRASH, 1999). Im Menschen wird sie als 15-Lipoxygenase bezeichnet (MILLER et al., 2003).

Verschiedene Studien über 12-HETEs lassen auf eine Vielzahl von zellulären Funktionen schließen. Sie sind u.a. in folgende Prozesse involviert: Zellvitalität und Apoptose (TANG et al., 1995), Metastasenbildung (CHEN et al., 1994) und Angiogenese (NIE et al., 2000). Sie spielen eine wichtige Rolle bei der Aufrechterhaltung der Homöostase von tierischen Zellen und sind an zahlreichen pathogenen Prozessen wie Inflammation, Fieber, Arthritis und Krebs beteiligt.

Eine Beteiligung der HETEs an der Regulation des Aktinfilament-Netzwerkes und damit an der GLUT4-Translokation (Abb. 3) wurde in zahlreichen Untersuchungen, in denen u.a. die spezifische Bindung der 12-HETEs an Aktin nachgewiesen wurde, festgestellt. Die Metaboliten der Lipoxygenasereaktion stellen selektive Liganden der Aktinfibrillen dar (KANG und VANDERHOEK, 1998; KANG et al., 1999). Dabei soll durch die 12-HETEs eine spezifische PKC-abhängige Phosphorylierung der Aktinfibrillen ausgelöst werden. Dies führt zu einer Erhöhung des Aktingehaltes in der Zelle sowie zur Steigerung der Polymerisationsrate von Aktin (TANG et al., 1993a; TANG et al., 1993b; TANG et al., 1994; RICE et al., 1998). 1995 charakterisierten FREIRE-MOAR et al. die 12/15-Lipoxygenase im Herzmuskel und anderen Geweben. Nähere Untersuchungen zur Aktivität der 12/15-Lipoxygenase im Herzen wurden 1996 von BREITBART et al. durchgeführt. Dabei wurde der Nachweis der 12/15-Lipoxygenase in Mikrosomen und Zytosol von Rattenherzen und in kultivierten Kardiomyozyten der Ratte, erbracht.

DRANSFELD et al. haben eine Beteiligung der Lipoxygenase-Metaboliten, im Besonderen der 12-HETEs, an der Regulation des kardialen Glukosetransportes festgestellt (2001). Dabei wurde zunächst durch Immunofluoreszenz die 12/15-Lipoxygenase in adulten Kardiomyozyten der Ratte nachgewiesen. Weiterhin wurden mit gleicher Methode die Aktinfasern angefärbt und als parallel angeordnete Fasern

dargestellt. Durch den Einsatz der Lipxygenase-Inhibitoren Nordihydroguaiarensäure (NDGA) und Esculetin wurde der Insulin-induzierte Glukosetransport vollständig gehemmt. Als weiterer Hinweis diente die Inkubation von Kardiomyozyten mit Cytochalasin D, welches die Organisation des Aktinfilament-Netzwerkes hemmt. Die Zellen wurden mit Cytochalasin D, NDGA und Esculetin inkubiert und anschließend mit einem Aktinfilamentfarbstoff angefärbt. Dabei zeigten die mit Lipxygenase-Inhibitoren inkubierten Zellen eine ähnliche Anordnung der Aktinfilamente wie die Zellen, die mit Cytochalasin D inkubiert wurden. Dies führt zu der Annahme, dass die Inhibierung der 12/15-Lipxygenase zu einer Depolymerisation der Aktinfilamente und somit zur Hemmung der GLUT4-Translokation führt.





### 3 EIGENE UNTERSUCHUNGEN

#### 3.1 Material

##### 3.1.1 Chemikalien

6-Aminohexansäure	Sigma, Steinheim
Bio-Rad Protein Assay	Bio-Rad Laboratories, München
Dithiothreitol	Sigma, Steinheim
EDTA	Sigma, Steinheim
Insulin Actrapid® HM 40 I.E./ml (ge)	Novo Nordisk Pharma GmbH, Mainz
Isotonische Natriumchlorid-Lösung	Delta-Pharma, Pfullingen
Größenmarker	New England Biolabs, Frankfurt
Magermilchpulver	AppliChem GmbH, Darmstadt
Methanol	AppliChem GmbH, Darmstadt
Sodium Orthovanadat	Sigma, Steinheim
Natriumfluorid	Merck, Darmstadt
Narcoren	Merial, Hallbergmoos
Natriumchlorid	Merck, Darmstadt
Natriumdeoxycholat	Sigma
Prestained Protein Marker, Broad Range	New England Biolabs, Frankfurt
Proteasen-Inhibitoren-Cocktail (Tabletten)	Boehringer, Mannheim

---

Restore Western Blot Stripping Buffer	Pierce, Rockford, USA
Rinder-Serum-Albumin	Dade Behring, Marburg
Super Signal West Pico Luminol/Enhancer Solution	Pierce, Rockford, U.S.A
Super Signal West Pico Stable Peroxide Solution	Pierce, Rockford, U.S.A
Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan	Roth, Karlsruhe
Polyoxyethylene-Sorbitan Monolaurate (Tween 20)	Sigma, Steinheim
Uptilight HRP blot Reagent A	Interchim, Frankreich
Uptilight HRP blot Reagent B	Interchim, Frankreich

### 3.1.2 Antikörper

Primärantikörper	
Anti-12-LOX	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen die rekombinante Leukozyten-Isoform der 12/15-Lipoxygenase  (Cayman Chemical, MI, USA)
Anti-Akt	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen ein KLH gekoppeltes, synthetisches Peptid gerichtet gegen die Sequenz des C-Terminus der Akt der Maus  (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-GLUT4	Polyklonales Kaninchen-Peptid-Serum, gerichtet gegen Sequenz des C-Terminus von GLUT4  (Calbiochem, Bad Soden)
Anti-GSK3	Monoklonales Maus-Antiserum gerichtet gegen GSK3 $\alpha$ und GSK3 $\beta$ .  (Stressgen, Victoria, Canada)
Anti-p85	Polyklonales Kaninchen-Antiserum, gerichtet gegen die N-SH2 Region der PI3 Kinase, sowie gegen die intakte p85 Untereinheit der PI3 Kinase  (Upstate, Virginia, USA)

**Primärantikörper**

Anti-Phospho-GSK-3 $\alpha/\beta$	Polyklonales Kaninchen Antiserum, gerichtet gegen ein KLH-gekoppeltes synthetisches phospho-Ser21 Peptid  (Cell Signaling, Frankfurt)
Anti-Phospho-Akt	Polyklonales Kaninchen Antiserum, gerichtet gegen ein KLH-gekoppeltes, synthetisches Phospho-Ser473 Peptid  (Cell Signaling, Frankfurt)

**Sekundärantikörper**

Anti-Maus IgG (H+L), HRP Conjugate	Ziege Anti-Maus IgG (H+L), Meerrettich Peroxidase gekoppelt  (Promega, Mannheim)
Anti-Kaninchen IgG (H+L), HRP Conjugate	Ziege Anti-Kaninchen IgG (H+L), Meerrettich Peroxidase gekoppelt  (Promega, Mannheim)

### 3.1.3 Gele und Sonstiges

ExcelGel SDS Homogenous 7,5 %	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden
Filterpapier	Munktell, Schweden
Hybond-P: PVDF Membran, Porengröße 0,45 µm	Amersham Pharmacia, England
Pufferstreifen	Amersham Biosciences, Uppsala, Schweden

### 3.1.4 Geräte und Laborbedarf

Blotapparatur 2117-250 NovaBlot	Pharmacia Biotech
Film-Remover 2117-225	LKB Bromma
Horizontalelektrophorese-kammer Multiphor II	Pharmacia Biotech
Thermomixer 5436	Eppendorf, Hamburg
Ultra Turrax Tissue Homogenizer	Jahnke & Kunkel, Staufen
Zentrifuge 5417R	Eppendorf, Hamburg
Mastercycler Gradient®	Eppendorf, Hamburg
Lumi-Imager	Boehringer, Mannheim
Auto-Analyzer ACP-Eppendorf	Eppendorf, Hamburg

## 3.2 Methoden

### 3.2.1 Versuchstiere

Die Gewebe (Skelettmuskel und Herz) wurden aus adulten 20-30 g schweren männlichen und weiblichen C57/Bl6 Mäusen und Alox15-Knockout-Mäusen entnommen. Die Alox15-Knockout-Mäuse wurden von FUNK et al. (1996) generiert und von Jackson Laboratories (Bar Harbor, USA) bezogen. Die Zucht und Haltung der C57/Bl6 Mäuse sowie der Alox15-Knockout-Tiere erfolgte im Tierbereich des Deutschen Diabetes Zentrum Düsseldorf. Die Tiere wurden zu 4-5 Tieren in genormten Edelstahlkäfigen unter Standardbedingungen (Raumtemperatur 20°C, relative Luftfeuchte ca. 55 %, Tag-Nacht-Rhythmus 12 h durch Kunstlicht) gehalten. Trinkwasser und Futter (Alleinfutter für Mäusezucht) wurde ad libitum gegeben.

### 3.2.2 In vivo Stimulation

Sämtliche Präparationen wurden in der Zeit von 10.00 und 11.00 Uhr morgens durchgeführt. Die Tiere wurden durch eine i.p. Injektion von 10 mg Narcoren/kg KG (16 % (w/v) Pentobarbital-Natrium) narkotisiert. Danach wurde den Tieren Insulin (4 U/100 g) in die Schwanzvene injiziert. Parallel zu den stimulierten Tieren wurde Kontrolltieren (Basalwerte) eine Bolusinjektion mit steriler isotonischer Kochsalzlösung in die Schwanzvene verabreicht. Nach 20 min wurden die Gewebe, wie unter 3.2.2.1 und 3.2.2.2 beschrieben, exzidiert.

### 3.2.2.1 Gewebepräparationen

#### 3.2.2.1.1 Präparation des Ventrikelgewebes

Nach einer Wirkdauer von 20 min, wurden die Tiere mit einer Guillotine (Harvard Apparatus, South Natick, Massachusetts) dekapitiert. Sofort danach wurde Blut für die Blutglukosebestimmung mittels einer 20 µl Kapillare entnommen. Abdomen und Thorax wurden eröffnet, das Herz entnommen und in eiskalte isotone Kochsalzlösung überführt.

Um das überschüssige Blut zu entfernen wurde das Herz retrograd mit isotonischer NaCl-Lösung perfundiert. Danach erfolgen das sofortige Einfrieren in flüssigem Stickstoff und die Lagerung bei -70°C.

#### 3.2.2.1.2 Präparation der Leber

Nach der Herzentnahme wurde die Leber komplett entfernt. Sie wurde sofort nach der Entnahme in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

#### 3.2.2.1.3 Präparation des Skelettmuskels

Nach der Organentnahme wurden beide Hinterbeine vom Körper abgetrennt. Die Haut wurde entfernt um dann die gesamte Muskulatur von den Hintergliedmaßen abzutrennen. Das Muskelgewebe wurde nach Entfernung von Fett und Faszien sofort in flüssigem Stickstoff eingefroren und bei -70°C gelagert.

### 3.2.3 Aufschluss der Gewebe

Der Aufschluss der Gewebe erfolgte in eiskaltem Lysispuffer in einem konstanten Verhältnis von 20 mg Gewebe/2 ml Lysispuffer (w/v). Mit einer Ultraturrax wurden die Gewebe 3-4mal für jeweils 10 sec homogenisiert. Zwischendurch wurde jeweils eine 20 sec Pause zur Abkühlung des Gerätes eingehalten, um eine Erwärmung des Gewebes zu verhindern. Anschließend wurden die Proben auf Eis inkubiert. Nach 20 min wurde das Lysat in Eppendorfgefäße aliquotiert und für 1h bei 4°C auf dem Überkopfschüttler inkubiert. Nach einer Zentrifugation von 30 min in einer Kühlzentrifuge bei 14000 rpm wurde der Überstand abgenommen, aliquotiert und bei -20°C gelagert.

#### **Lysispuffer**

Tris/Cl, pH 7,5	50 mM
NaCl	150 mM
SDS	0,1 %
Triton x 100	1 %
Na-Deoxycholat	0,5 % (w/v)
EDTA	1 mM

#### *Frisch zugeben:*

NaF	100 mM
Na <sub>3</sub> VO <sub>4</sub>	10 mM
Protease Inhibitor Cocktail Tabletten	80 µl/ml

### 3.2.4 Proteinbestimmung

Die Proteinbestimmung der Proben wurde mit Hilfe eines auf der Methode von Bradford (BRADFORD, 1976) beruhenden Bio-Rad-Proteintestes (Bio-Rad, München) durchgeführt. Die Lysatproben und die aus Rinderserumalbumin (reinst) hergestellte Standard-Proteinlösung (1 mg/ml) wurden in H<sub>2</sub>O verdünnt, mit jeweils 0,2 ml Bio-Rad-Reagenz versetzt und gemischt. Nach einer Inkubationszeit von ca. 15 min konnte die Extinktion bei  $\lambda=595$  nm gemessen und die daraus resultierende Proteinkonzentration berechnet werden.



### 3.2.5 Gelelektrophoretische Auftrennung von Proteinen

Für alle Versuche wurden zur Auftrennung der Proteine 0,5 mm dicke, foliengebundene Gele verwendet. Als Puffer dienten Excel-Pufferstreifen von Amersham Biosciences. Die Proben wurden durch Zugabe von Wasser auf die gleiche Proteinkonzentration gesetzt, mit 4x Laemmli-Probenpuffer versetzt und 10 min bei 95°C im Thermo-block erhitzt. Nachdem die Proben abgekühlt waren, wurden sie kurz abzentrifugiert. Die Elektrophorese erfolgte in einer Horizontalelektrophoresekammer bei einer konstanten Temperatur von 13°C, einer konstanten Stromstärke von 30 mA und einer variablen Spannung bis maximal 600 V. Bei diesen Parametern betrug die Laufzeit ca. 2 h und 15 min. Als Molekulargewichtsmarker dienten verschiedene Proteinmischungen (LMW-Marker, BR-Marker), die unter den gleichen experimentellen Bedingungen verwendet wurden.

#### 4x Laemmli-Probenpuffer

Glycerin	40 % (v/v)
SDS	8 % (w/v)
Bromphenolblau	0,01 % (w/v)
β-Mercaptoethanol	5 % (v/v)
Tris, pH 6,8	250 mM

Folgende Pufferstreifen wurden für die gelelektrophoretische Auftrennung der Proteine verwendet:

Anode (pH 6,6)		Kathode (pH 7,1)	
Tris/Acetat	0,45 M	Tris	0,08 M
SDS	0,4 % (w/v)	Tricin	0,8 M
		SDS	0,6 % (w/v)

### 3.2.6 Transfer der Proteine auf Membranen

Nach Beendigung der Elektrophorese wurden die aufgetrennten Proteine in einer Semidry-Blot-Apparatur mit Graphitelektroden auf PVDF-Membranen transferiert. Zu diesem Zweck wurden 6 Filterpapiere auf die entsprechende Gelgröße zurechtgeschnitten, in Anodenlösung I getränkt und auf die mit Wasser angefeuchtete Anodenplatte gelegt. Das Gel wurde für 5 min in Anodenlösung II äquilibriert. Danach wurde das Gel auf einen speziellen Film-Remover gelegt, um die Trägerfolie abzutrennen. Die Blotmembran, die ebenfalls in Anodenlösung II äquilibriert wurde, wird auf das Gel gelegt und mit 3 in Anodenlösung II getränkten Filterpapieren bedeckt. Das ganze Paket wurde kopfüber auf die Filterpapiere, die auf der Anodenplatte liegen, gebracht.

Nach Entfernung der Trägerfolie wurden 9 in Kathodenlösung getränkte Filterpapiere auf das Gel gelegt. Nach der Entfernung von Luftblasen wurde das Paket mit der mit Wasser angefeuchteten Kathoden-Graphitplatte abgedeckt. Folgende Transferbedingungen wurden gewählt: 35 V, 5 W, 150 mA, 133 mA/h.

Für den Transfer der Proteine wurden folgende Pufferlösungen verwendet:

<b>Anodenlösung I</b>	300 mmol/l	Tris
	20 % (v/v)	Methanol
<b>Anodenlösung II</b>	25 mmol/l	Tris
	20 % (v/v)	Methanol
<b>Kathodenlösung</b>	40 mmol/l	6-Aminohexansäure
	0,01 % (w/v)	SDS
	20 % (v/v)	Methanol

### 3.2.7 Immunodetektion

Die Blotmembranen wurden nach dem Proteintransfer zur Absättigung spezifischer Bindungsstellen für 1 h in Blockierlösung bei Raumtemperatur inkubiert. Anschließend wurden die Membranen 3 x kurz mit TBS-Tween gewaschen und für ca. 16 h (ü.N.) bei 6°C mit der jeweiligen spezifischen Antikörperlösung inkubiert. Nach Waschen mit TBS/Tween für je 3 x 5 min bzw. 3 x 10 min wurden die Membranen mit einem für den primären Antikörper spezifischen sekundären Antikörper in TBS-Tween und Milchpulver (3 %, 5 % bzw. 10 %) für 1 h bei RT inkubiert. Dann wurde die Membran erneut 3 x 10 min mit TBS-Tween gewaschen und schließlich für ca. 5 min in einer Mischung aus Uptilight HRP blot Reagent A und Reagent B im Volumenverhältnis 1:1 inkubiert. Mit Hilfe eines LUMI-Imagers und der dazugehörigen LUMI-Analyst-Software wurden die Signale densitometrisch ausgewertet und quantifiziert.

<b>10x TBS-Puffer</b>	<b>TBS-Tween</b>
Tris	0,1 M 1x TBS
NaCl	1 M Tween 0,05% bzw. 0,1% (v/v)

#### 3.2.7.1 Strippen der Blotmembran

Die Methode des „Stripping“ der an der Membran gebundenen Antikörper ermöglicht die Wiederverwendung von bereits detektierten Membranen durch Abtrennung der Antikörperkomplexe. Die Membranen wurden in Stripping-Puffer bei für 30 min inkubiert. Danach wurde der Stripping-Puffer verworfen und die Membranen für jeweils 2 x 15 min in TBS-Tween-Puffer gewaschen. Es erfolgte die Absättigung der unspezifischen Bindungen mit Blockierlösung und die erneute Inkubation mit einem Primärantikörper nach dem unter 3.2.7 beschriebenen Verfahren.

### 3.2.8 Bestimmung der Blutglukose

Bei jeder Gewebeentnahme wurde den Tieren Blut entnommen, um die Blutglukosekonzentration zu bestimmen. Diese wurde mit Hilfe der Hexokinase-Methode an einem Auto-Analyzer ACP-Eppendorf bestimmt. Dazu wurden 20 µl Vollblut in 500 µl Hämolyse-Lösung lysiert.

**Hämolyse-Lösung:**

Digitonin	0,04 mM
Maleinimid	1 mM

### 3.2.9 Genotypisierung der Alox15-Knockout-Mäuse

#### 3.2.9.1 Isolierung von genomischer DNA aus Lebergewebe

Zur Isolierung der genomischen DNA wurde den Mäusen die Leber entnommen und mittels eines DNeasy Tissue Kit nach dem Protokoll des Herstellers die DNA isoliert. Dazu wurde 25 mg zerkleinertes Lebergewebe mit 180 µl Gewebelysispuffer 1 (ATL) unter Zugabe von 20 µl Proteinase K bei 55°C ü.N. inkubiert. Nach der Inkubation wurde das Lysat kurz durchmischt, 200 µl Gewebe-Lysis-Puffer 2 (AL) dazugegeben und bei 70°C für 10 min inkubiert. Nach Zugabe von 200 µl Ethanol wurde das Lysat durchmischt, in ein spezielles 2 ml Gefäß überführt und bei 8000 rpm 1 min zentrifugiert. Das Sediment wurde in ein neues 2 ml Gefäß überführt, 500 µl Lysis-Puffer I (AW1) dazugegeben und bei 8000 rpm 1 min zentrifugiert. Der Überstand wurde erneut abgenommen, das übriggebliebene Pellet mit 500 µl Lysis-Puffer II (AW2) vermischt und bei 14000 rpm 3 min zentrifugiert. Das Sediment wurde wieder in ein 2 ml Eppendorfgefäß überführt, 200 µl Lysis-Puffer III (AE) direkt auf die Membran gegeben, 1 min bei RT inkubiert und dann bei 8000 rpm 1 min zentrifugiert. Der letzte Schritt wurde noch einmal wiederholt.

### 3.2.9.2 Polymerase-Kettenreaktion

Die Polymerase-Kettenreaktion ist die selektive enzymatische in-vitro-Amplifikation eines beliebigen DNA Abschnittes. Die PCR erfolgte in dem Mastercycler Gradient® in 39 Temperaturzyklen.

<b>Reaktionsschema der PCR-Genotypisierung</b>				
	<b>Stufe 1</b>	<b>Stufe 2</b>	<b>Stufe 3</b>	<b>Stufe 4</b>
<b>Denaturierung</b>	94°C/3 min	94°C/30 sec	94°C/30 sec	-
<b>Annealing</b>	-	64°C*/30 sec	58°C/30 sec	-
<b>Extension</b>	-	72°C/1 min	72°C/1 min	72°C/2 min
<b>Zyklus/en</b>	1	12	25	1
* Temperaturabnahme pro Zyklus: 0,5°C (nur bei Annealing-Temperatur/Stufe)				

Die Primersequenzen wurden anhand eines Protokolls der Firma Jackson übernommen, die produzierten Alox15-Knockout-Mäuse nach diesen Bedingungen genotypisiert. Die Primer für das intakte Alox15-Gen generieren ein 266 bp großes Fragment bei der Amplifikation des Exon 3. Bei dem mutierten Exon 3 des Alox15 Gens wird ein 280 großes DNA Fragment (Neomycin-Resistent-Gen-Insert) generiert. Die Synthese der Primer erfolgte durch die Firma: MWG-BIOTECH (Ebersberg).

**Primer zur Amplifikation des des Alox15-Gens (Exon 3):**

Wildtyp (forward): 5' – CGT GGT TGA AGA CTC TCA AGG – 3'

Wildtyp (reverse): 5' – CGA AAT CGC TGG TCT ACA GG – 3'

**Primer zur Amplifikation des Neomycin-Resistenz-Gens:**

Alox15-Mutante (forward): 5' – CTT GGG TGG AGA GGC TAT TC – 3'

Alox15-Mutante (reverse): 5' – AGG TGA GAT GAC AGG AGA TC – 3'

### 3.2.10 Berechnung und Statistik

Die statistischen Berechnungen der Signifikanzen wurden nach der Methode des Students t-test für gepaarte und ungepaarte Daten erhoben. Die Datenanalyse wurde mit Hilfe des Computerprogrammes Prism 3.0 (GraphPad, San Diego, CA) durchgeführt. Die Daten wurden jeweils als Mittelwerte  $\pm$  SEM (Standardabweichung der Mittelwerte) dargestellt, die Signifikanzgrenze bei  $p < 0,05$  festgelegt. Alle phosphospezifischen Signale wurden auf das Protein p85 normiert.

### 3.3 Ergebnisse

Grundlage aller vorliegenden Untersuchungen war die Alox15-Knockout-Maus, eine transgene Mauslinie, die eine vollständige (homozygote) Deletion des Alox15 Gens aufweist (FUNK, et al. 1996).

Die transgenen Mäuse wurden auf den genetischen Hintergrund des C57/Bl6-Mäusestammes zurückgekreuzt. Als genetisch unveränderte Kontrolltiere wurden C57/Bl6-Mäuse verwendet. Alle Tiere wiesen bei der Probenentnahme ein Alter von 3-5 Monaten auf. Um eine vollständige Charakterisierung zu ermöglichen wurden sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet. Die Alox15-Knockout-Tiere zeigten hinsichtlich ihres äußeren Erscheinungsbildes und ihrer Konstitution keine Unterschiede. Es konnten keine signifikanten Differenzen im Körpergewicht zwischen Alox15-Knockout-Tieren und Wildtyp-Mäusen festgestellt werden (Tab. 3).

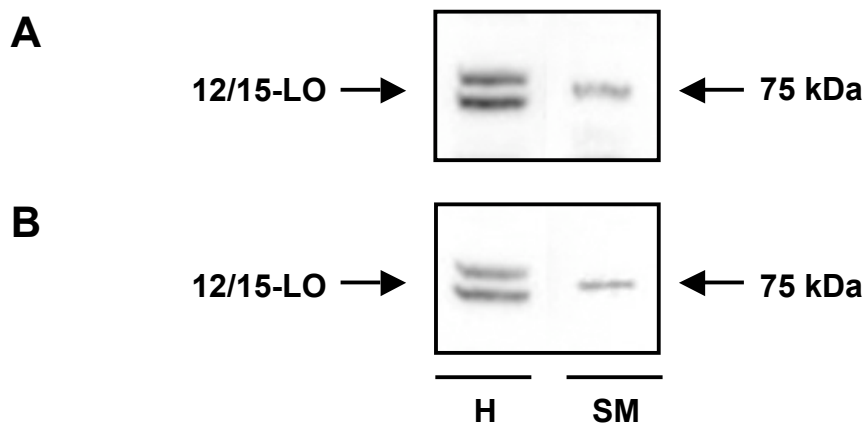
Alter	Gewicht	
	männlich	weiblich
90 d	18-20 g	20-24 g
120 d	20-24 g	24-28 g
150 d	24-28 g	28-30 g

**Tab. 3**     *Durchschnittliches Alter und Körpergewicht der Alox15-Knockout- und C57/Bl6-Mäuse*

### 3.3.1 Lipoxygenaseexpression in Herz und Skelettmuskel der Alox15-Knockout-Maus

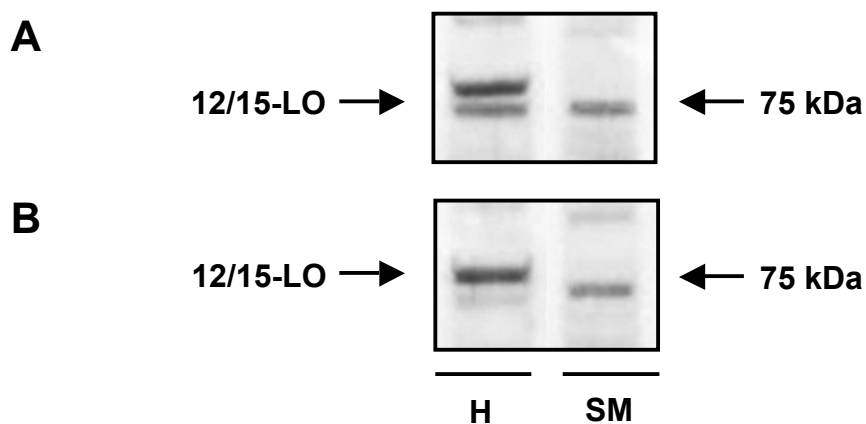
Die Lipoxygenaseexpression in verschiedenen Geweben sollte proteinbiochemisch bestimmt werden. Dazu wurden die Tiere narkotisiert (3.2.2) und Herz und Skelettmuskel entnommen (3.2.2.1). Diese wurden lysiert (3.2.3) und die Proteinkonzentrationen der Lysate mittels der Methode nach Bradford bestimmt (3.2.4). Nach Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (3.2.5), wurden sie auf eine PVDF-Membran transferiert (3.2.6) und mit einem Antikörper gegen die 12/15-Lipoxygenase immunodetektiert (3.2.7). Wie in Abb. 5 dargestellt ist, wird die 12/15-Lipoxygenase in verschiedenen Geweben der Wildtyp-Mäuse unterschiedlich hoch exprimiert. Im Herzen wurde eine Doppelbande detektiert, die vermutlich durch die eng miteinander verwandten Lipoxygenase-Isoformen entsteht. Im Vergleich dazu wurde im Skelettmuskel nur eine Bande detektiert und eine schwächere Expression der 12/15-Lipoxygenase nachgewiesen. Interessanterweise wurde auch in den Geweben der Alox15-Knockout-Tiere die 12/15-Lipoxygenase nachgewiesen (Abb. 6), obwohl durch die Genotypisierung einiger Tiere der gleichen Generation der Beweis der Deletion des Alox15 Gens erbracht wurde (siehe Abb. 7). Es zeigten sich keine signifikanten Unterschiede in der Expression der 12/15-Lipoxygenase zwischen Wildtyp-Mäusen und Alox15-Knockout-Mäusen. Wie im Schrifttum bereits Erwähnung fand, existieren zahlreiche Isoformen der Lipoxygenasen, die eine hohe Homologie untereinander besitzen (BRASH, 1999). Weiterhin spricht die Doppelbande, die im Herzen detektiert wurde dafür, dass hier nicht nur die 12/15-Lipoxygenase detektiert wurde, sondern auch nah verwandte Isoformen. In einigen Arbeiten konnte mit einem spezifischen Antikörper im Vergleich zum Wildtyp keine 12/15-Lipoxygenase-Expression in verschiedenen Zellen nachgewiesen werden (SUN und FUNK, 1996; KIM et al., 2003). Es ist davon auszugehen, dass es sich hier um eine Detektion anderer Isoformen der Lipoxygenasen handelt, aufgrund der mangelnden Spezifität des polyklonalen Antikörpers.





**Abb. 5 12/15-Lipoxygenase-Expression in Wildtyp-Mäusen**

Darstellung repräsentativer Western Blots von Lysaten von Herz (H) und Skelettmuskel (SM) von männlichen (A) und weiblichen (B) Wildtyp-Mäusen. Herz und Skelettmuskel wurden entnommen und lysiert. Die Proteine wurden per SDS-PAGE (7,5 %ig) aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen 12/15-Lipoxygenase (12/15-LO) immunodetektiert

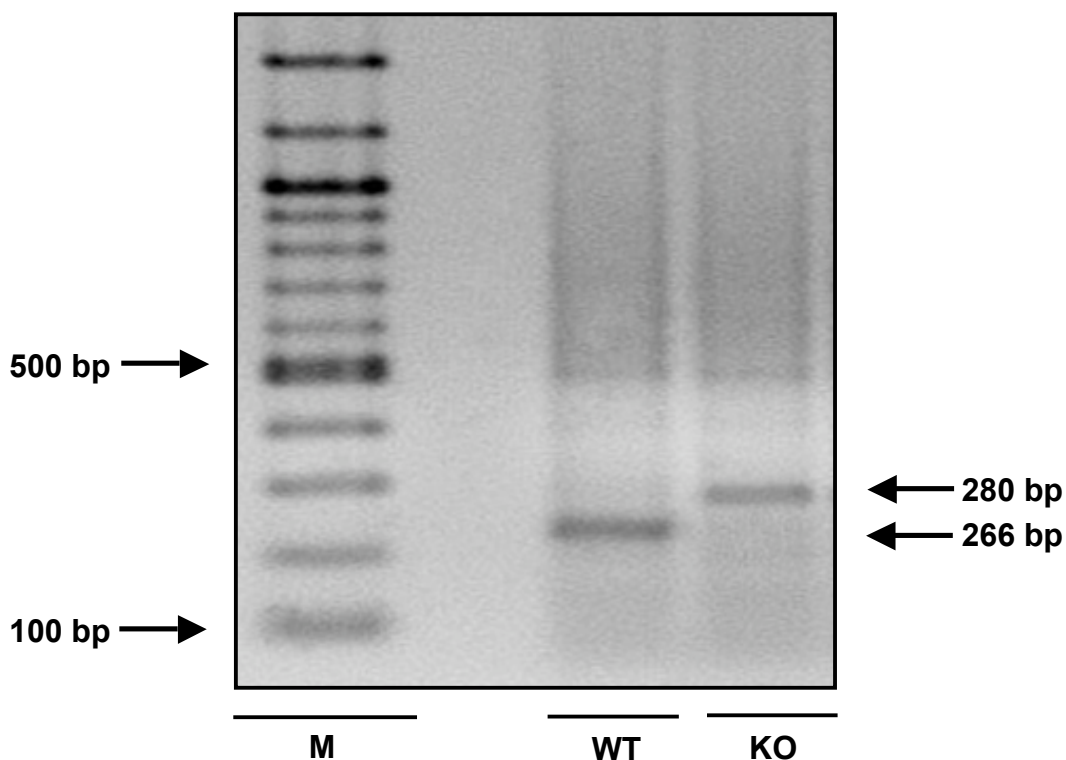


**Abb. 6 12/15-Lipoxygenase-Expression in Alox15-Knockout-Tieren**

Darstellung repräsentativer Western Blots von Lysaten von Herz (H) und Skelettmuskel (SM) von männlichen (A) und weiblichen (B) Alox15-Knockout-Tieren. Herz und Skelettmuskel wurden entnommen und lysiert. Die Proteine wurden per SDS-PAGE (7,5 %ig) aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen 12/15-Lipoxygenase (12/15-LO) immunodetektiert

### 3.3.2 Genotypisierung der Alox15-Knockout-Maus

Um die Inaktivierung des Alox15-Gens zu bestätigen wurde eine Genotypisierung durchgeführt. Zur Untersuchung des Genotypes wurden Wildtyp-Mäusen und Alox15-Knockout-Tieren die Leber entnommen (3.2.2.1.2) und lysiert (3.2.9.1). Die genomische DNA der eingesetzten Mäuse wurde aus dem Lebergewebe isoliert (3.2.9.1) und mittels einer PCR-gestützten DNA-Analyse untersucht (3.2.9.2). Anstelle des Exons 3 des Alox15 Gens tragen die Alox15-Knockout-Mäuse eine Neomycin-Resistenz-Kassette. Das intakte Alox15-Gen ergibt in der PCR ein 266 bp großes Fragment, das Neomycin-Resistenz-Gen ein 280 bp großes Fragment (Abb. 7). Aus der Versuchsreihe wurden repräsentativ sechs Tiere der F1-Generation genotypisiert.



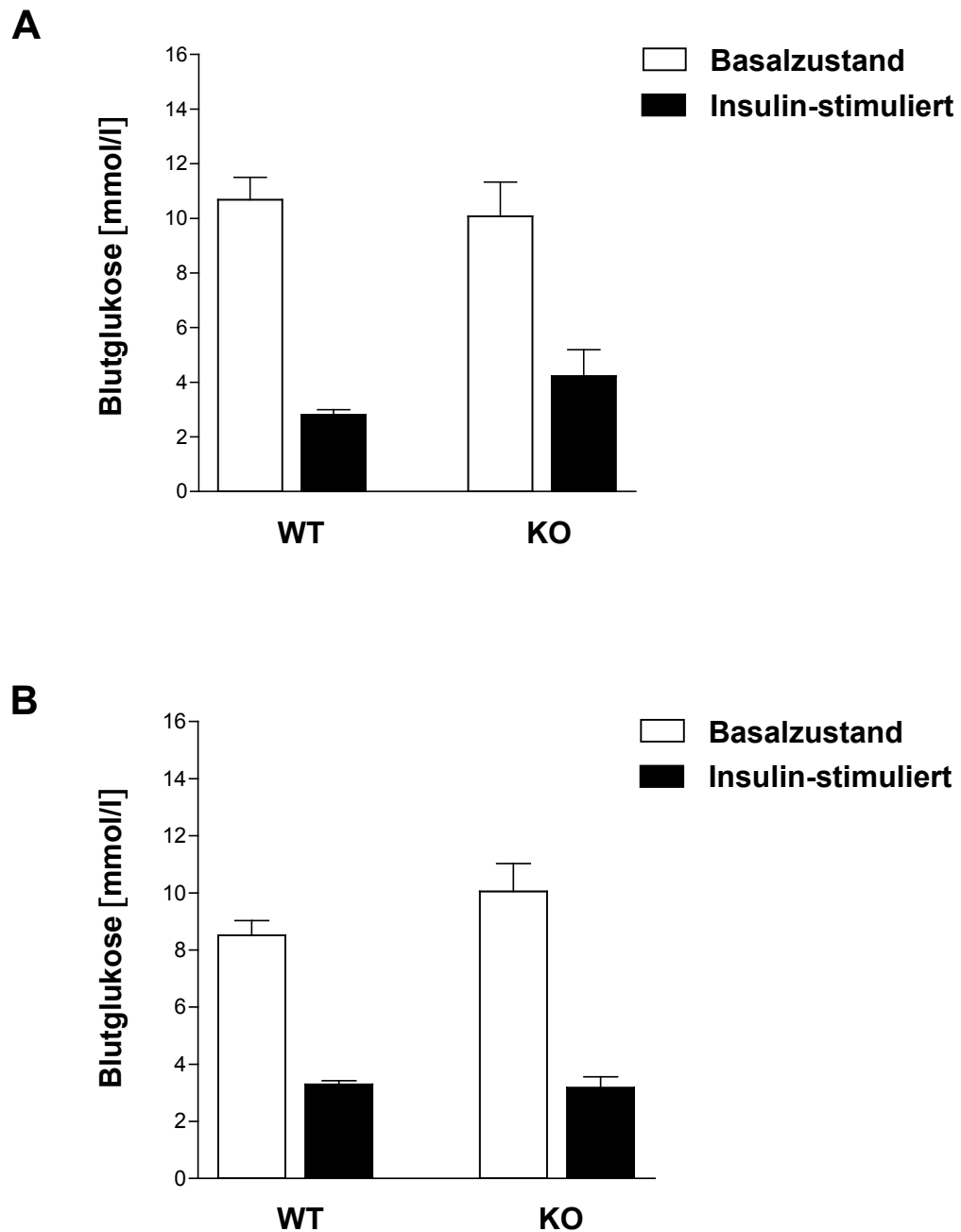
**Abb. 7 Genotypisierung der Alox15-Knockout-Maus**

Repräsentative Darstellung einer Genotypisierung transgener Mäuse. Inverse Darstellung eines 1,5 %igen, gefärbten Agarosegels zur Auftrennung der PCR-Produkte aus genomischer DNA einer Wildtyp-Maus (**WT**) und einer homozygoten Alox15-Knockout-Maus (**KO**). 100 bp Leiter als Größenstandard (**M**)

### 3.3.3 Untersuchung des Plasmaglukosespiegels in Alox15-Knockout-Mäusen im Basalzustand und nach Insulinstimulus

Es wurde die Hypothese aufgestellt, dass die Alox15-Knockout-Tiere eine Insulinresistenz sowie Diabetes mellitus Typ 2 entwickelt haben können. Da ein Hauptcharakteristikum des Diabetes mellitus Typ 2 ein erhöhter Plasmaglukosespiegel ist, wurde dieser in den Alox15-Knockout-Tieren untersucht. Weiterhin sollte die Reaktion der Tiere auf einen Insulinstimulus überprüft werden, um Anzeichen einer Insulinresistenz zu erkennen.

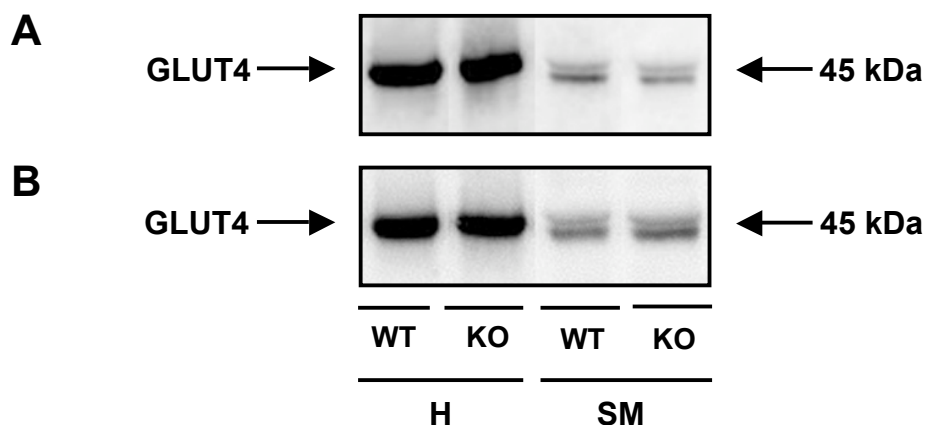
Bei jeder Gewebeentnahme wurde Wildtyp-Mäusen sowie Alox15-Knockout-Mäusen 20 µl Vollblut nach der Dekapitation entnommen, mit 500 µl Hämolyselösung versetzt und dann der Plasmaglukosegehalt bestimmt (3.2.8). Wie in Abb. 8A dargestellt ist, konnten keine signifikanten Unterschiede in der basalen Glukosekonzentration im Blut zwischen männlichen Wildtyp-Tieren und Alox15-Knockout-Tieren festgestellt werden. Die Abb. 8B zeigt die basalen Plasmaglukosespiegel der weiblichen Alox15-Knockout-Tiere und Wildtyp-Mäuse, die sich ebenfalls nicht signifikant unterscheiden. Wie aus Abb. 8A ersichtlich ist, verringert sich nach Insulinstimulus die Plasmaglukosekonzentration bei den männlichen Alox15-Knockout-Tieren um 58 % im Vergleich zu Wildtyp-Mäusen, bei denen eine Verminderung um 73 % stattfindet. Bei den männlichen Knockout-Mäusen ist der Abfall des Plasmaglukosespiegels nach Insulinstimulus tendenziell geringer. Dieser Unterschied zur Wildtyp-Maus ist nicht signifikant. In den weiblichen Alox15-Knockout-Tieren verringert sich der Plasmaglukosespiegel nach Insulinstimulus um 58 %, beim Wildtyp liegt eine 66 %ige Verminderung vor. Es kommt somit sowohl bei der männlichen als auch bei der weiblichen Knockout-Maus zu einer deutlichen Senkung des Plasmaglukosespiegels nach Insulinstimulus.



**Abb. 8 Plasmaglukosespiegel im Basalzustand und nach Insulinstimulus**  
Wildtyp-Mäusen (WT) und Alox15-Knockout-Tieren (KO) wurden 20  $\mu$ l Blut entnommen, mit 500  $\mu$ l Hämolyselösung versetzt und die Glukosekonzentration bestimmt. Dargestellt sind die Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der Plasmaglukosewerte von männlichen (A) und weiblichen (B) Tieren mit  $n=9-13$ .  
ungepaarter  $t$ -test, Referenzwerte Maus: 5,94-10,56 mmol/l

### 3.3.4 Untersuchung der GLUT4-Expression in Herz und Skelettmuskel der Alox15-Knockout-Maus

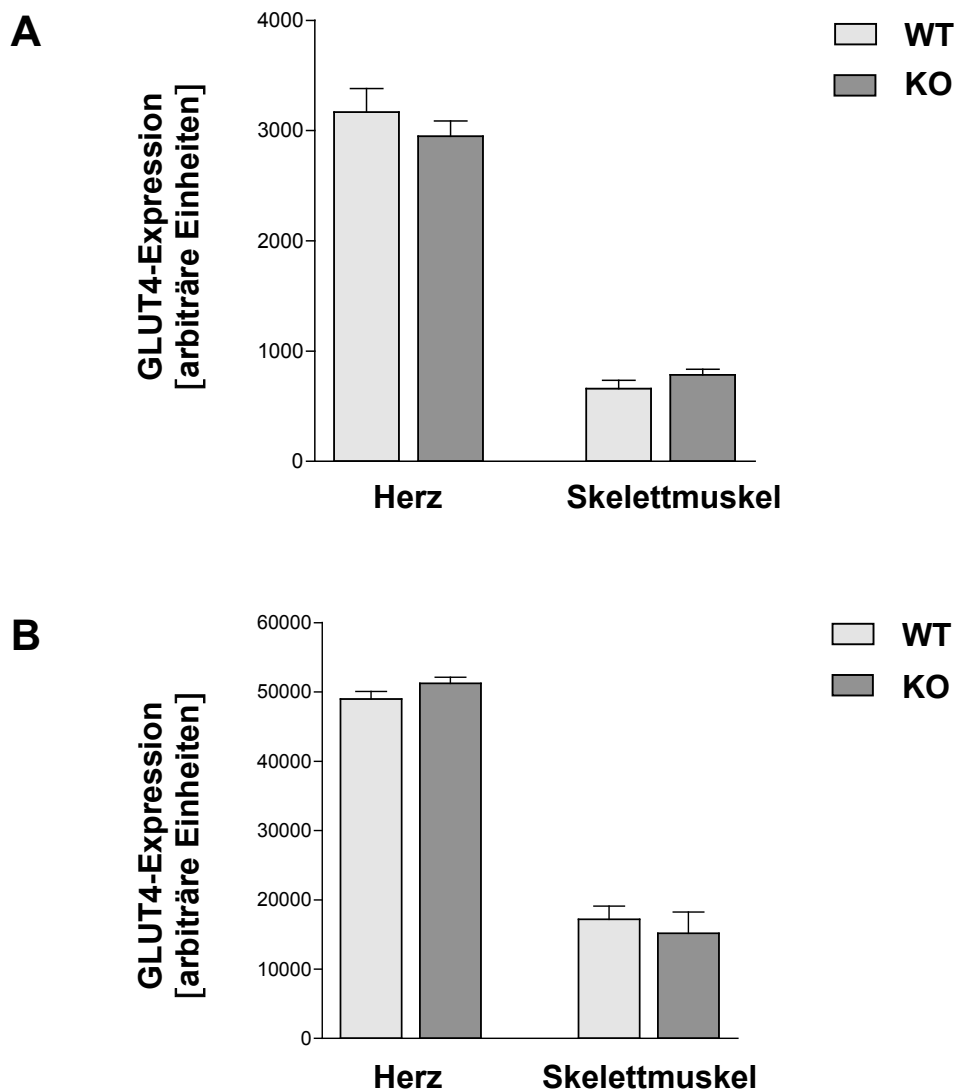
Zur Charakterisierung des Alox15-Knockout-Mausmodells war es notwendig, die GLUT4-Expression in Herz und Skelettmuskel nachzuweisen. Dabei sollte ein möglicher Einfluss der 12/15-Lipoxygenase-Inaktivierung auf den GLUT4-Gehalt überprüft werden. Um die GLUT4-Expression zu bestimmen wurden den Alox15-Knockout-Mäusen und den Wildtyp-Mäusen Herz und Skelettmuskel entnommen (3.2.2.1). Die Gewebe wurden lysiert (3.2.3) und die Proteinkonzentrationen nach der Methode von Bradford (3.2.4) bestimmt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.5), auf eine PVDF-Membran transferiert (3.2.6) und mit einem GLUT4 Antikörper immunodetektiert (3.2.7). Sowohl bei den Wildtyp-Tieren als auch bei den Alox15-Knockout-Tieren konnte GLUT4 bei einem Molekulargewicht von 45 kDa in beiden Geweben nachgewiesen werden (Abb. 9). Der Nachweis erfolgte sowohl in weiblichen als auch in männlichen Tieren. Im Skelettmuskel zeigte sich bei Wildtyp-Mäusen und Knockout-Tieren eine charakteristische Doppelbande bei 45 kDa.



**Abb. 9 GLUT4-Expression in Herz und Skelettmuskel**

Darstellung repräsentativer Western Blots. Lysate von Herz (H) und Skelettmuskel (SM) von männlichen (A) und weiblichen (B) Wildtyp-Mäusen (WT) und Alox15-Knockout-Mäusen (KO) wurden per SDS-PAGE (7,5 %ig) aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen GLUT4 immunodetektiert.

Wie aus der Abb. 10 ersichtlich ist, ergab die Quantifizierung weder in Skelettmuskel noch im Herz signifikante Unterschiede in der GLUT4 Expression zwischen Wildtyp-Mäusen und den Alox15-Knockout-Tieren. Der GLUT4-Gehalt ist im Herz deutlich höher als im Skelettmuskel.



**Abb. 10 Darstellung der Quantifizierung der GLUT4-Expression**

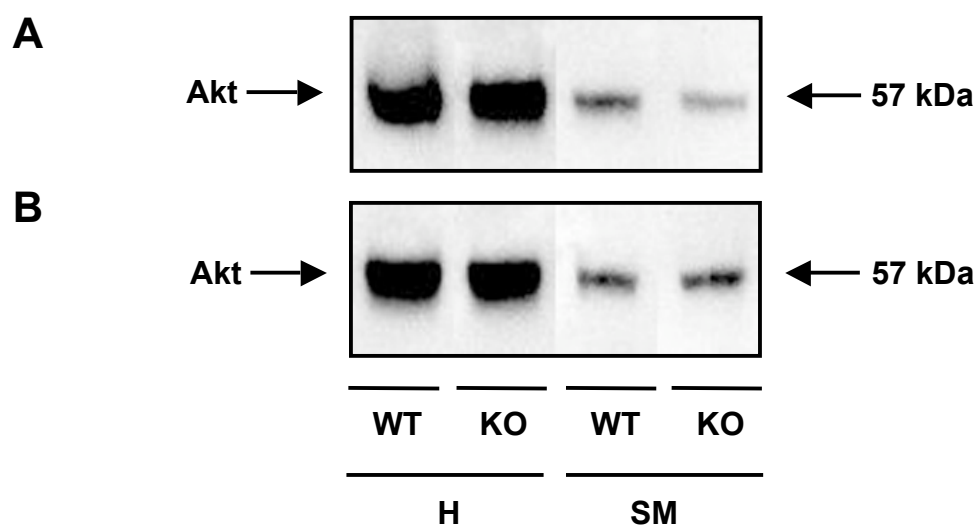
Darstellung der Quantifizierung der Western Blots als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten Werte von  $n=6$  einzelnen Tieren. **A.** Männliche Tiere **B.** Weibliche Tiere ungepaarter  $t$ -test

### 3.3.5 Auswirkungen der Inaktivierung der 12/15-Lipoxygenase auf die Insulinsignaltransduktion in Herz und Skelettmuskel

#### 3.3.5.1 Untersuchung der Akt-Expression

Eine bedeutende Rolle im Glukosetransport und der Glykogensynthese wird der Proteinkinase Akt zugeschrieben. Voraussetzung für die Beurteilung der Akt-Phosphorylierung ist der Nachweis der Akt-Expression. Um diese nachzuweisen, wurden männlichen und weiblichen Wildtyp-Mäusen sowie Alox15-Knockout-Tieren Herz und Skelettmuskel entnommen (3.2.2.1), lysiert (3.2.3) und die Proteinkonzentrationen nach der Methode von Bradford bestimmt (3.2.4). Nach der Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (3.2.5), wurden diese auf eine PVDF-Membran transferiert (3.2.6) und mit einem Antikörper gegen Akt immunodetektiert (3.2.7). Wie aus der Abb. 11 ersichtlich ist, konnte die Akt-Expression im Herzen der Wildtyp-Tiere und der Alox15-Knockout-Tiere nachgewiesen werden. Sowohl bei den weiblichen als auch bei den männlichen Mäusen ist eine Bande bei einem Molekulargewicht von 57 kDa detektierbar. Die Abb. 11 stellt weiterhin die Expression der Akt im Skelettmuskel von Wildtyp-Tieren und Alox15-Knockout-Tieren im Western Blot dar. Sie konnte sowohl beim Wildtyp als auch beim Knockout-Tier nachgewiesen werden. Die Quantifizierung der Western Blots (Abb. 12) zeigt keine signifikanten Unterschiede der Akt-Expression im Herzen der Wildtyp-Maus und der Alox15-Knockout-Maus. Bei den weiblichen und männlichen Tieren wird deutlich mehr Akt im Herzen exprimiert als im Skelettmuskel.

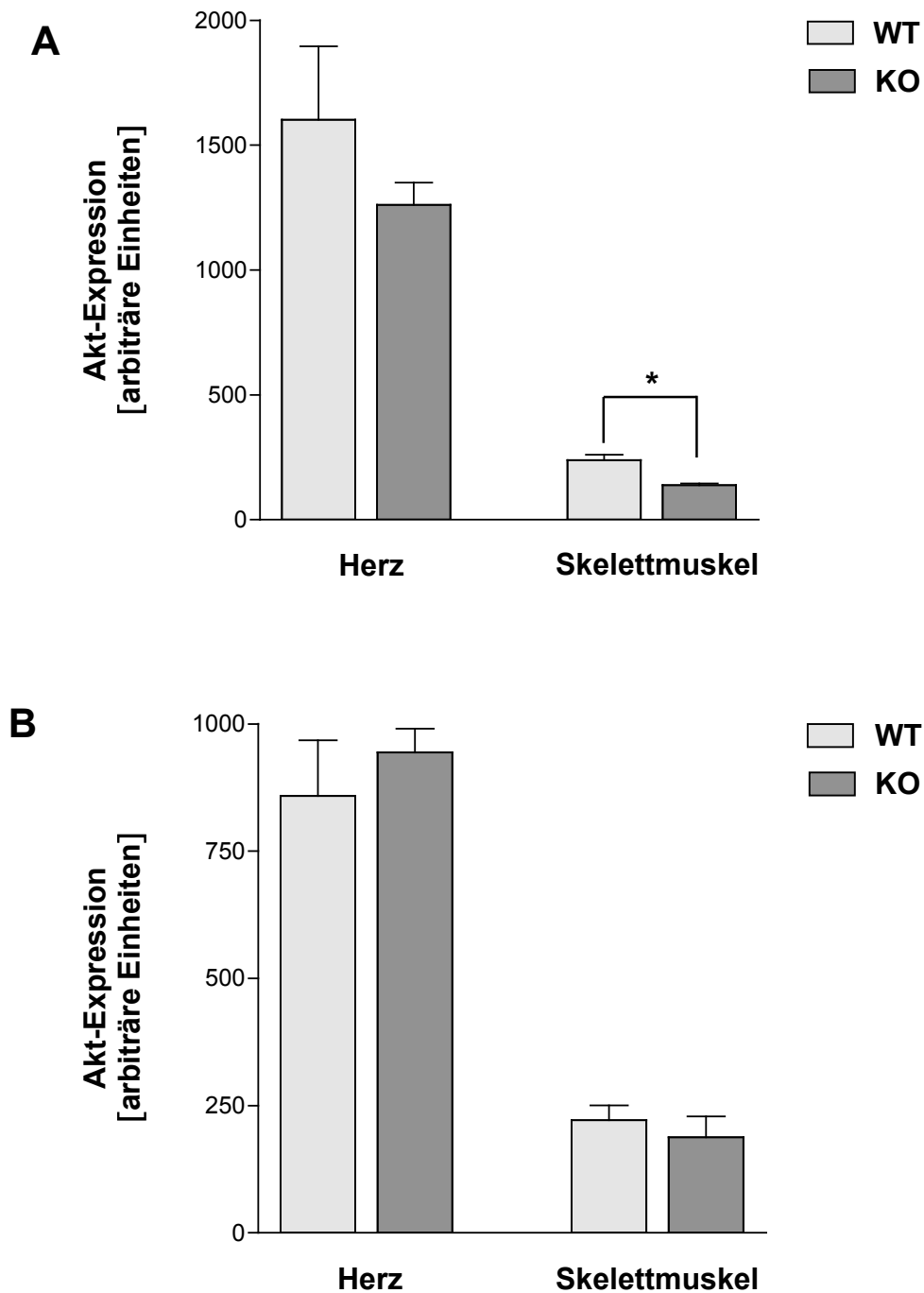
Die Quantifizierung der Akt-Expression im Skelettmuskel der weiblichen Wildtyp-Mäuse und der Alox15-Knockout-Tiere (Abb. 12B) zeigt keine signifikanten Unterschiede. Im Gegensatz dazu wird im Skelettmuskel von männlichen Alox15-Knockout-Tieren weniger Akt im Vergleich zum Wildtyp exprimiert (Abb. 12A). Die Akt-Expression ist um das 2fache geringer. Dieser Unterschied ist signifikant.



**Abb. 11 Akt-Expression in Herz und Skelettmuskel**

Darstellung repräsentativer Western Blots. Lysate von Herz (**H**) und Skelettmuskel (**SM**) von männlichen und weiblichen (**B**) Wildtyp-Mäusen (**WT**) und Alox15-Knockout-Tieren (**KO**) wurden per SDS-PAGE (7,5 %ig) aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen Akt immunodetektiert.





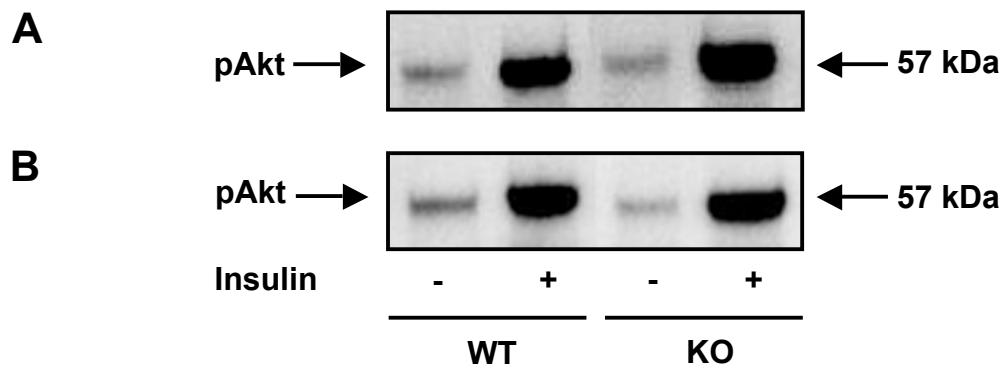
**Abb. 12 Darstellung der Quantifizierung der Akt-Expression**

Darstellung der Quantifizierung der Western Blots als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten Werte von  $n=3$  einzelnen Tieren. **A.** Männliche Tiere. **B.** Weibliche Tiere ungepaarter  $t$ -test; Signifikanz mit  $p=0,05$

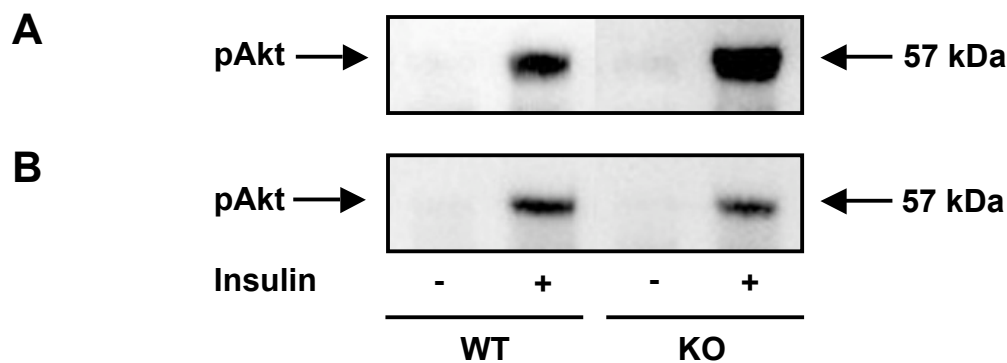
### 3.3.5.2 Untersuchung der Akt-Phosphorylierung im Basalzustand und nach Insulinstimulus

Akt gilt als ein Schlüsselenzym in der Insulinsignalkaskade und als wichtiger Regulator des Glukosetransportes. Es phosphoryliert, nach Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor, GSK3 $\alpha$  und - $\beta$  und hat somit Einfluss auf die Glykogensynthese. Weiterhin reguliert Akt die GLUT4-Translokation und wird ebenfalls über ein Aktinzytoskelett zur Plasmamembran transportiert. In einigen Untersuchungen konnte eine Verminderung der Akt-Phosphorylierung bzw. einer Isoform der Akt bei Diabetes mellitus Typ 2 und Insulinresistenz nachgewiesen werden. Mit der Untersuchung der Akt-Phosphorylierung sollten einerseits der direkte Einfluss der 12/15-Lipoxygenase und andererseits mögliche Anzeichen einer Insulinresistenz festgestellt werden. Zur Untersuchung der Akt-Phosphorylierung wurde einem Teil der Tiere nach der Narkotisierung 4 U/100 g KG Insulin injiziert, den anderen wurde die gleiche Menge sterile NaCl-Lösung i.v. verabreicht. (3.2.2). Nach 20 min wurden den Tieren Herz- und Skelettmuskel entnommen (3.2.2.1). Nach dem Aufschluss der Gewebe (3.2.3) wurden die Proteinkonzentrationen mit Hilfe einer Methode nach Bradford (3.2.4) bestimmt. Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE aufgetrennt (3.2.5), auf PVDF-Membranen transferiert (3.2.6) und mit einem pAkt-Antikörper immunodetektiert (3.2.7).

Bei den unbehandelten Wildtyp-Mäusen und Alox15-Knockout-Mäusen konnte eine schwache Phosphorylierung der Akt bei einem Molekulargewicht von 57 kDa nachgewiesen werden (Abb. 13). Im Insulin-stimulierten Herzen zeigte sich ein Anstieg der Phosphorylierung bei den Wildtyp-Mäusen sowie bei den Alox15-Knockout-Mäusen. Die Proteinbanden der weiblichen und männlichen Tiere stellen sich im Western Blot ähnlich dar (Abb. 13). In Abb.14 ist die Phosphorylierung der Akt im Skelettmuskel dargestellt. Eine schwache Phosphorylierung der Akt ist bei der Wildtyp- und Alox15-Knockout-Maus erkennbar. Im Skelettmuskel der Insulin-stimulierten Tiere konnte bei beiden ein Anstieg der Akt-Phosphorylierung nachgewiesen werden (Abb.14).

**Abb. 13 Akt-Phosphorylierung im Herzen**

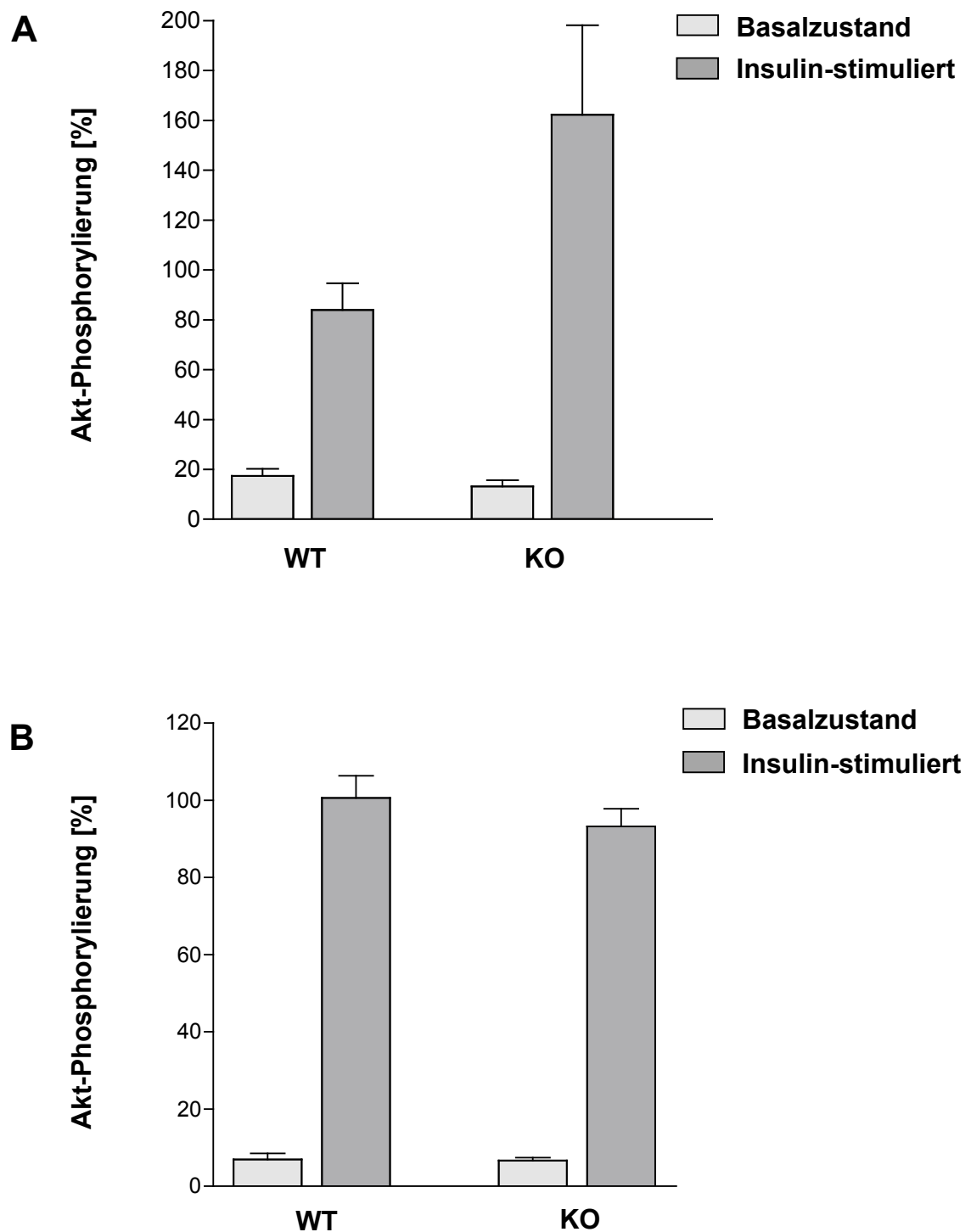
Darstellung repräsentativer Western Blots. Von männlichen (A) und weiblichen (B) Kontrolltieren (WT) und Alox15-Knockout-Tieren (KO) wurden im Basalzustand (-) und nach Insulinstimulus (+) das Herz entnommen und lysiert. Die Proteine wurden per SDS-PAGE (7,5 %ig) aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen pAkt immunodetektiert

**Abb. 14 Akt-Phosphorylierung im Skelettmuskel**

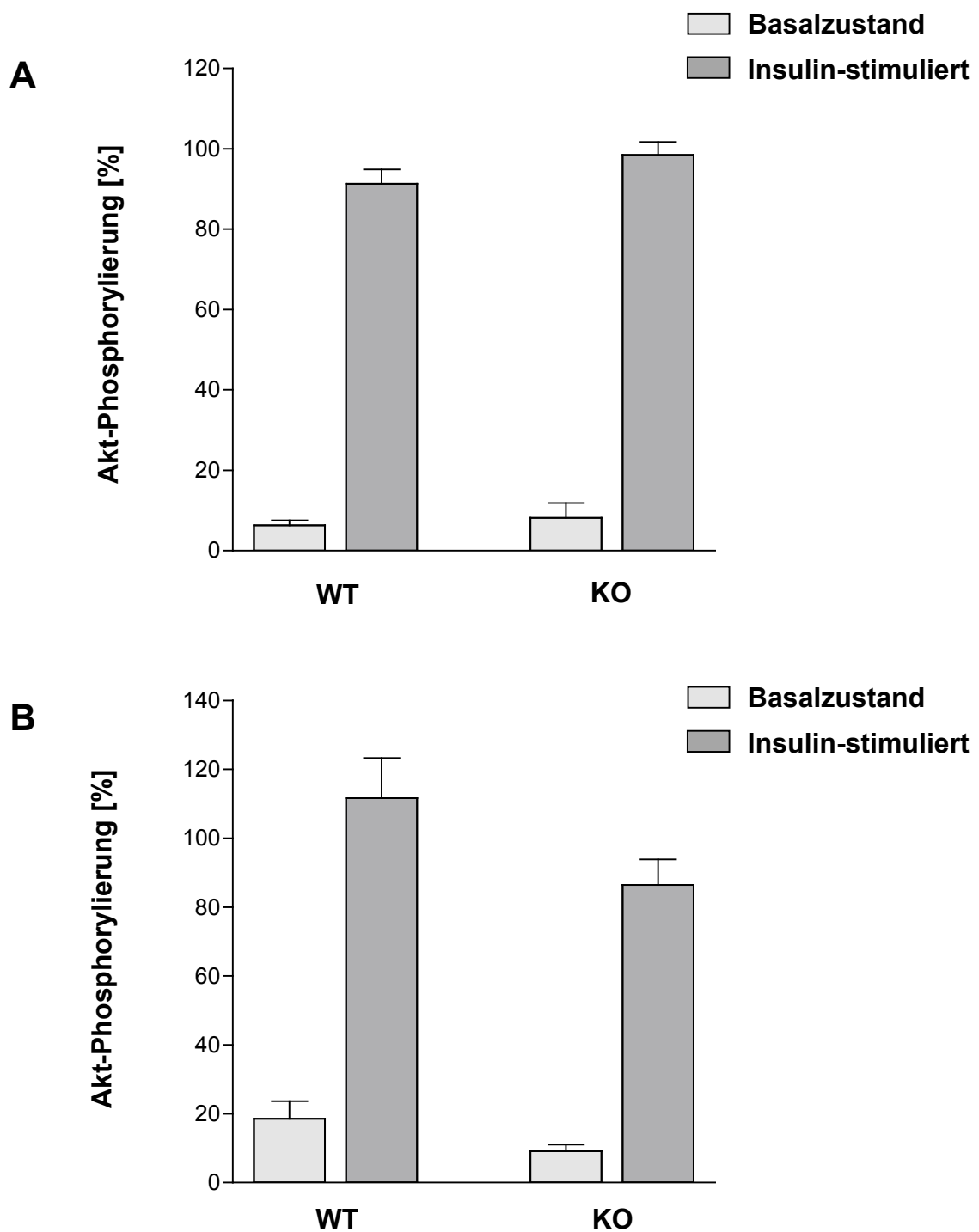
Darstellung repräsentativer Western Blots. Von männlichen (A) und weiblichen (B) Kontrolltieren (WT) und Alox15-Knockout-Tieren (KO) wurden im Basalzustand (-) und nach Insulinstimulus (+) das Herz entnommen und lysiert. Die Proteine wurden per SDS-PAGE (7,5 %ig) aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen pAkt immunodetektiert

Die Quantifizierung der Western Blots (Abb. 15) zeigt, dass keine signifikanten Unterschiede zwischen den Basalwerten im Herzen der Wildtyp-Mäuse und der Alox15-Knockout-Mäuse bestehen. Auch geschlechtsspezifische Unterschiede sind nicht vorhanden. Bei den Insulin-stimulierten Herzen der männlichen Tiere steigt die Akt-Phosphorylierung bei den Wildtyp-Mäusen um das 4,5fache, bei den Alox15-Knockout-Mäusen um das 10,7fache an (Abb.15A). Dieser Unterschied ist nicht signifikant. Die Abb. 15B zeigt einen Anstieg der Akt-Phosphorylierung in Insulin-stimulierten Herzen der weiblichen Wildtyp-Tiere um das 12,5fache; in der Alox15-Knockout-Maus steigt die Phosphorylierungsrate um das 11,9fache an.

Die Quantifizierung der Western Blots (Abb. 16) zeigt keine signifikanten Unterschiede der basalen Akt-Phosphorylierung im Skelettmuskel von Wildtyp- und Alox15-Knockout-Tieren. Die Phosphorylierung ist in den weiblichen Tieren tendenziell höher als in den männlichen Tieren. In den Insulin-stimulierten Skelettmuskeln konnte bei den männlichen Wildtyp-Mäusen ein Anstieg der Akt-Phosphorylierung um das 11fache, bei den Alox15-Knockout-Tieren um das 10fache gezeigt werden (Abb. 16A). Im Skelettmuskel der weiblichen Wildtyp-Mäuse konnte eine 5,5fache Steigerung und bei den Alox15-Knockout-Mäusen eine 8,5fache Steigerung festgestellt werden (Abb. 16B). Dieser Unterschied ist nicht signifikant.



**Abb. 15** Darstellung der Quantifizierung der Akt-Phosphorylierung im Herzen  
Darstellung der Quantifizierung der Western Blots als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten Werte von  $n=4-5$  einzelnen Tieren. **A.** Männliche Tiere. **B.** Weibliche Tiere ungepaarter  $t$ -test



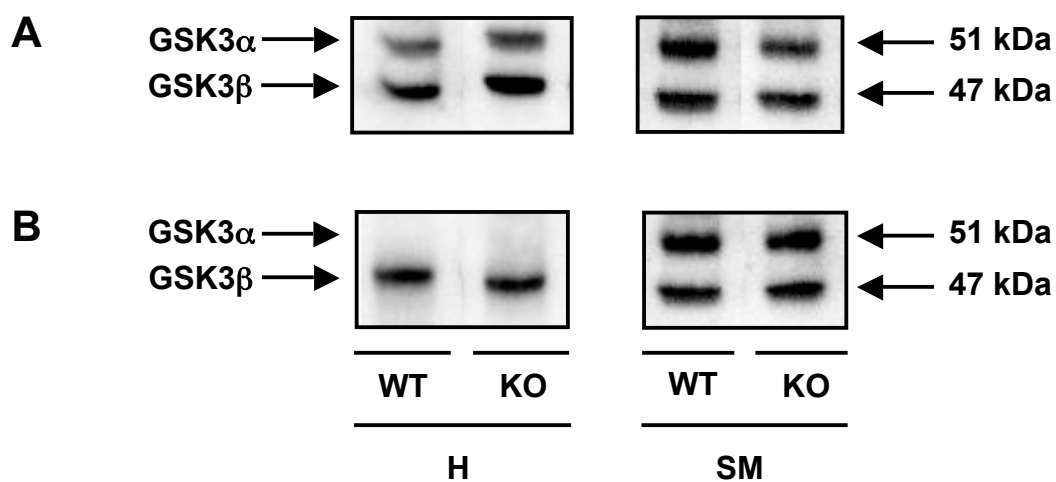
**Abb. 16** Darstellung der Quantifizierung der Akt-Phosphorylierung im Skelettmuskel

Darstellung der Quantifizierung der Western Blots als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten Werte von  $n=4-5$  einzelnen Tieren. **A.** Männliche Tiere **B.** Weibliche Tiere ungepaarter  $t$ -test

### 3.3.5.3 Untersuchung der GSK3-Expression

GSK3 wird in der Insulinsignalkaskade von der Proteinkinase Akt phosphoryliert und führt zu einer erhöhten Glykogensynthese. Im Skelettmuskel von Diabetes mellitus Typ 2 Patienten ist der GSK3-Proteingehalt erhöht. Zur Beurteilung der GSK3-Phosphorylierung ist ein Nachweis der GSK3-Expression notwendig. Zur Untersuchung des GSK3-Gehalts wurde den Wildtyp-Tieren und den Alox15-Knockout-Tieren Herz und Skelettmuskel entnommen (3.2.2.1) und lysiert (3.2.3). Die Proteinkonzentrationen der Lysate wurden mit Hilfe einer Methode nach Bradford bestimmt (3.2.4). Danach erfolgte die elektrophoretische Auftrennung der Proteine mittels SDS-PAGE (3.2.5) und der Transfer der Proteine auf eine PVD-Membran (3.2.6). Anschließend wurden diese mit einem Antikörper gegen GSK3 $\alpha\beta$  immunodetektiert (3.2.7).

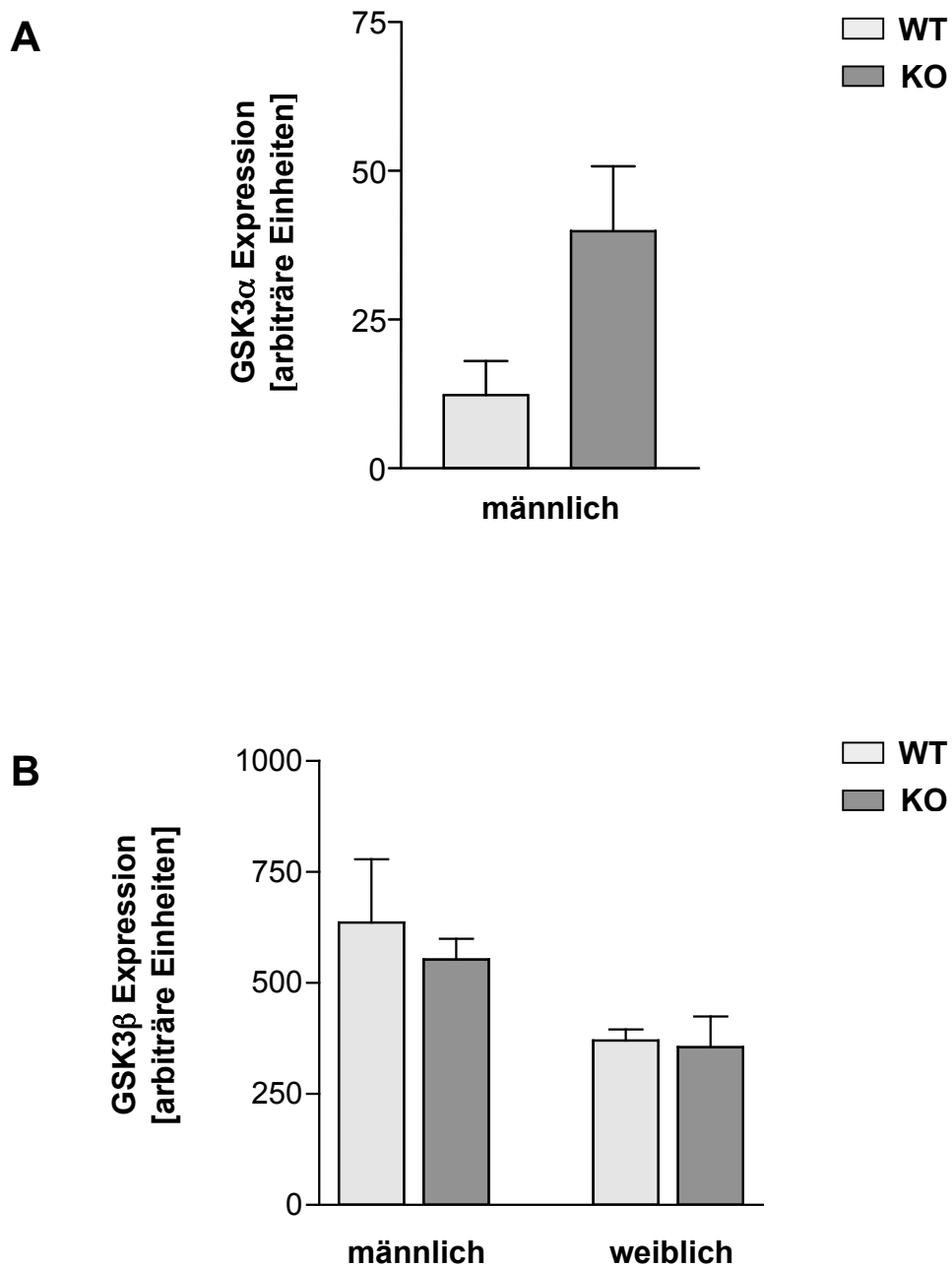
Wie aus Abb. 17A ersichtlich ist, konnte die GSK3 $\alpha$ - und die GSK3 $\beta$ -Expression im Skelettmuskel und Herzen sowohl beim Wildtyp als auch beim Knockout in männlichen Tieren nachgewiesen werden. Im Western Blot ist jeweils bei 47 und 51 kDa eine Bande detektierbar. Im Skelettmuskel der männlichen Wildtyp-Mäuse sowie bei den Alox15-Knockout-Tieren ist in Abb. 17B die Expression der beiden Isoformen  $\alpha$  und  $\beta$  dargestellt. Im Herzen der weiblichen Tiere konnte mit den vorhandenen Methoden nur die GSK3 $\beta$  proteinbiochemisch nachgewiesen werden, wobei die GSK3 $\alpha$ -Expression nur mit einer Probenanzahl  $n < 3$  gezeigt werden konnte. Da aber wie unter Punkt 3.3.5.4 ersichtlich ist, die GSK3 $\alpha$ -Phosphorylierung im weiblichen Wildtyp und Knockout nachgewiesen werden konnte, kann davon ausgegangen werden, dass eine GSK3 $\alpha$ -Expression bei diesen Tieren in Herz und Skelettmuskel vorhanden ist und vermutlich unterhalb der Detektionsgrenze liegt. Die Quantifizierung der Western Blots zeigt weder bei der GSK3 $\alpha$  (Abb. 18A und 19A) noch bei der  $\beta$ -Isoform (Abb. 18B und 19B) signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout.



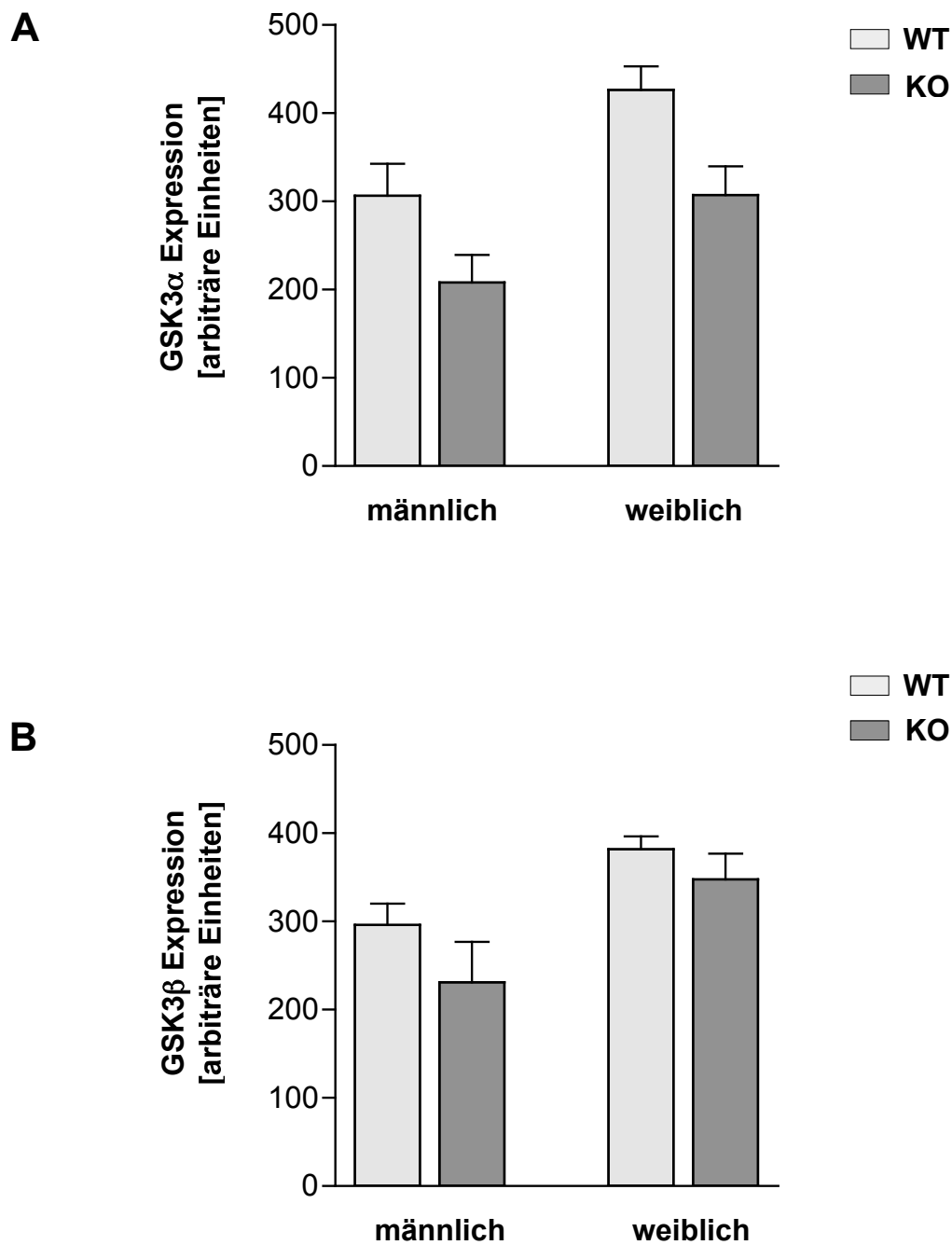
**Abb. 17 GSK3 $\alpha\beta$ -Expression in Herz und Skelettmuskel**

Darstellung repräsentativer Western Blots. Lysate von Herz (**H**) und Skelettmuskel (**SM**) von männlichen (**A**) und weiblichen (**B**) Kontrolltieren (**WT**) und Alox15-Knockout-Tieren (**KO**) wurden per SDS-PAGE (7,5 %ig) aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen GSK3 $\alpha\beta$  immunodetektiert





**Abb. 18 Darstellung der Quantifizierung GSK3 $\alpha\beta$ -Expression im Herzen**  
Darstellung der Quantifizierung der Western Blots als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten Werte von  $n=3$  einzelnen Tieren. **A.** GSK3 $\alpha$  **B.** GSK3 $\beta$   
ungepaarter  $t$ -test



**Abb. 19 Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\alpha/\beta$  Expression im Skelettmuskel**

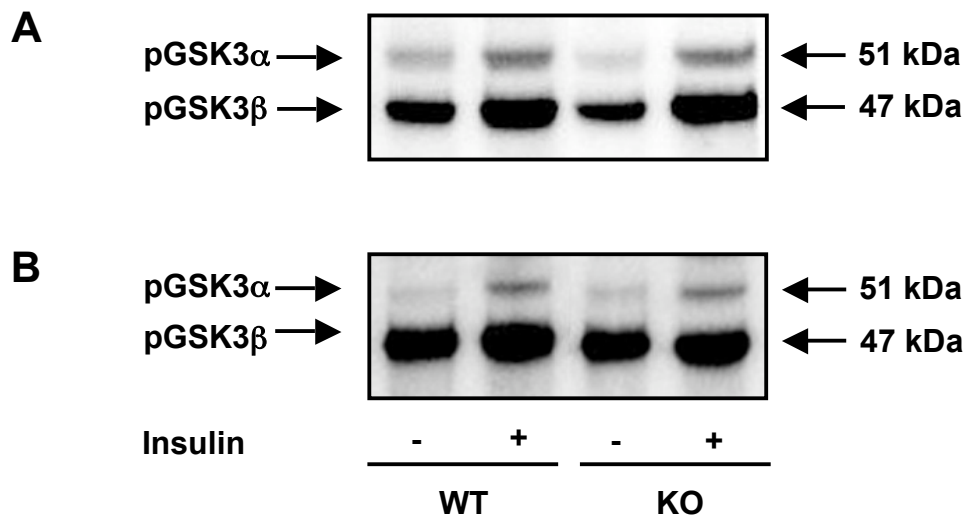
Darstellung der Quantifizierung der Western Blots als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten Werte von  $n=3$  einzelnen Tieren. **A.** GSK3 $\alpha$  **B.** GSK3 $\beta$   
ungepaarter t-test

#### 3.3.5.4 Untersuchung der GSK3-Phosphorylierung im Basalzustand und nach Insulinstimulus

Nach Insulinstimulation wird GSK3 als Element der Insulinsignalkaskade phosphoryliert. Um Auswirkungen der Inaktivierung der 12/15-Lipoxygenase auf die Aktivierung von GSK3 auszuschließen und Anzeichen einer Insulinresistenz festzustellen, wurde die GSK3-Phosphorylierung in der Alox15-Knockout-Maus untersucht. Um diese Phosphorylierung nachzuweisen, wurde einem Teil der Tiere 4 U/100 g KG Insulin in die Schwanzvene injiziert, den anderen wurde die gleiche Menge sterile NaCl-Lösung i.v. verabreicht (3.2.2). Nach einer Wartezeit von 20 min wurden den Wildtyp-Mäusen und den Alox15-Knockout-Tieren Herz und Skelettmuskel entnommen (3.2.2.1). Nach der Lysis der Gewebe (3.2.3) erfolgte die Bestimmung der Proteinkonzentrationen mit einer Methode nach Bradford (3.2.4). Die Proteine wurden mittels SDS-PAGE elektrophoretisch aufgetrennt (3.2.5), auf eine PVDF-Membran transferiert (3.2.6) und mit einem Antikörper gegen GSK3 $\alpha$  und - $\beta$  immunodetektiert (3.2.7).

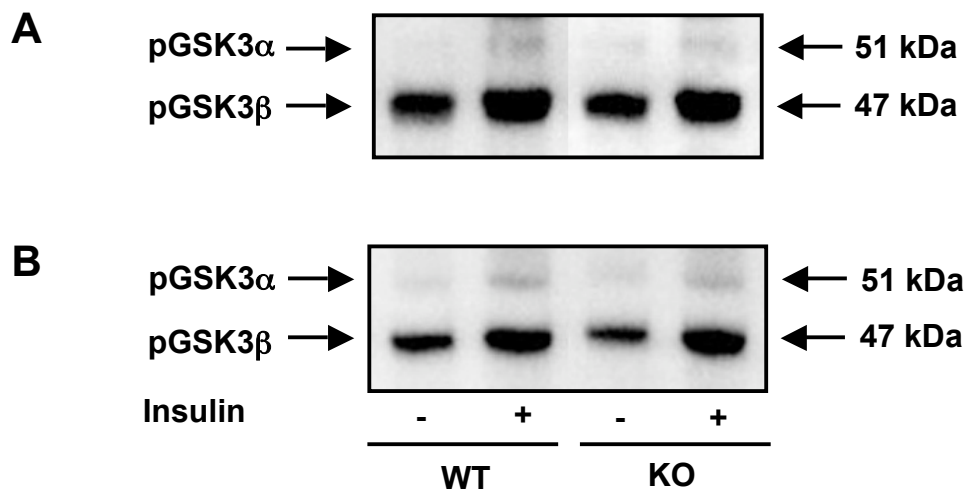
Wie aus der Abb. 20 ersichtlich ist, konnte eine schwache Phosphorylierung der GSK3 $\alpha$  im Herzen, im Basalzustand bei Wildtyp-Mäusen und Alox15-Knockout-Tieren, nachgewiesen werden. Es konnte eine Proteinbande bei 51 kDa detektiert werden. Im Insulin-stimulierten Herzen ist eine stärkere Intensität der Proteinbanden im Vergleich zum Basalzustand zu sehen. Die Phosphorylierung der  $\beta$ -Isoform der GSK3 im Herzen von Wildtyp-Mäusen und Alox15-Knockout-Tieren konnte ebenfalls im Basalzustand nachgewiesen werden. Im Vergleich dazu zeigten die Insulin-stimulierten Herzgewebe deutlich stärkere Proteinbanden bei 47 kDa im Western Blot (Abb. 20). Der Nachweis der Phosphorylierung der beiden Isoformen der GSK3 nach Insulinstimulus konnte also für beide Isoformen bei männlichen (Abb. 20A) und weiblichen (Abb. 20B) Tieren erbracht werden. Allerdings ist die  $\beta$ -Isoform deutlich stärker im Western Blot detektierbar.

Die Abb. 21 zeigt die Phosphorylierung von GSK3 $\alpha\beta$  im Skelettmuskel im Basalzustand und nach Insulingabe bei Wildtyp-Mäusen und Alox15-Knockout-Tieren. Im unbehandelten Skelettmuskel ist im Western Blot eine schwache Bande bei 51 kDa zu sehen, d.h. GSK3 $\alpha$  wird im Basalzustand nur gering phosphoryliert. Im Insulin-stimulierten Skelettmuskel ist die Proteinbande etwas intensiver. Bei 47 kDa ist eine stärkere Bande (GSK3 $\beta$ ) erkennbar, die sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch bei den Alox15-Knockout-Tieren vorhanden ist. Eine Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  konnte also im Wildtyp und in den Knockout-Tieren im Basalzustand nachgewiesen werden. Wie in Abb. 21 verdeutlicht ist, zeigen Insulin-stimulierte Skelettmuskel von Wildtyp- wie auch von Alox15-Knockout-Tieren einen Anstieg der Phosphorylierung. Es ist ersichtlich, dass dieser Anstieg der Phosphorylierung sowohl bei männlichen (Abb. 21A) als auch bei weiblichen (Abb. 21B) Tieren stattfindet.



**Abb. 20 GSK3 $\alpha\beta$ -Phosphorylierung im Herzen**

Darstellung repräsentativer Western Blots. Von männlichen (**A**) und weiblichen (**B**) Kontrolltieren (**WT**) und Alox15-Knockout-Tieren (**KO**) wurden im Basalzustand (-) und nach Insulinstimulus (+) das Herz entnommen und lysiert. Die Proteine wurden per SDS-PAGE (7,5 %ig) aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen pGSK3 $\alpha\beta$  immunodetektiert

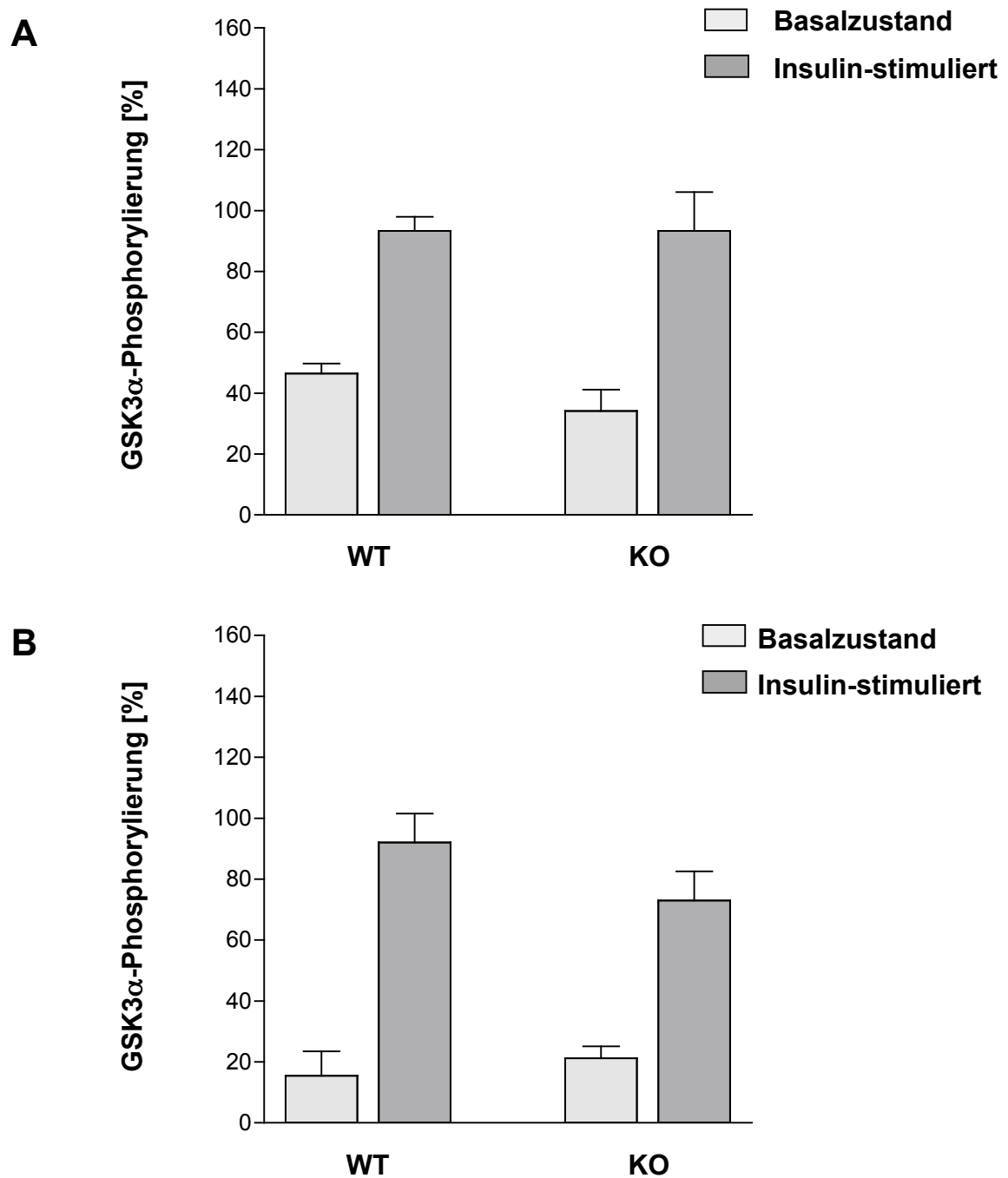


**Abb. 21 GSK3 $\alpha\beta$ -Phosphorylierung im Skelettmuskel**

Darstellung repräsentativer Western Blots. Von männlichen (**A**) und weiblichen (**B**) Kontrolltieren (**WT**) und Alox15-Knockout-Tieren (**KO**) wurden im Basalzustand (-) und nach Insulinstimulus (+) Skelettmuskel entnommen und lysiert. Die Proteine wurden per SDS-PAGE (7,5 %ig) aufgetrennt und mit einem Antikörper gegen pGSK3 $\alpha\beta$  immunodetektiert

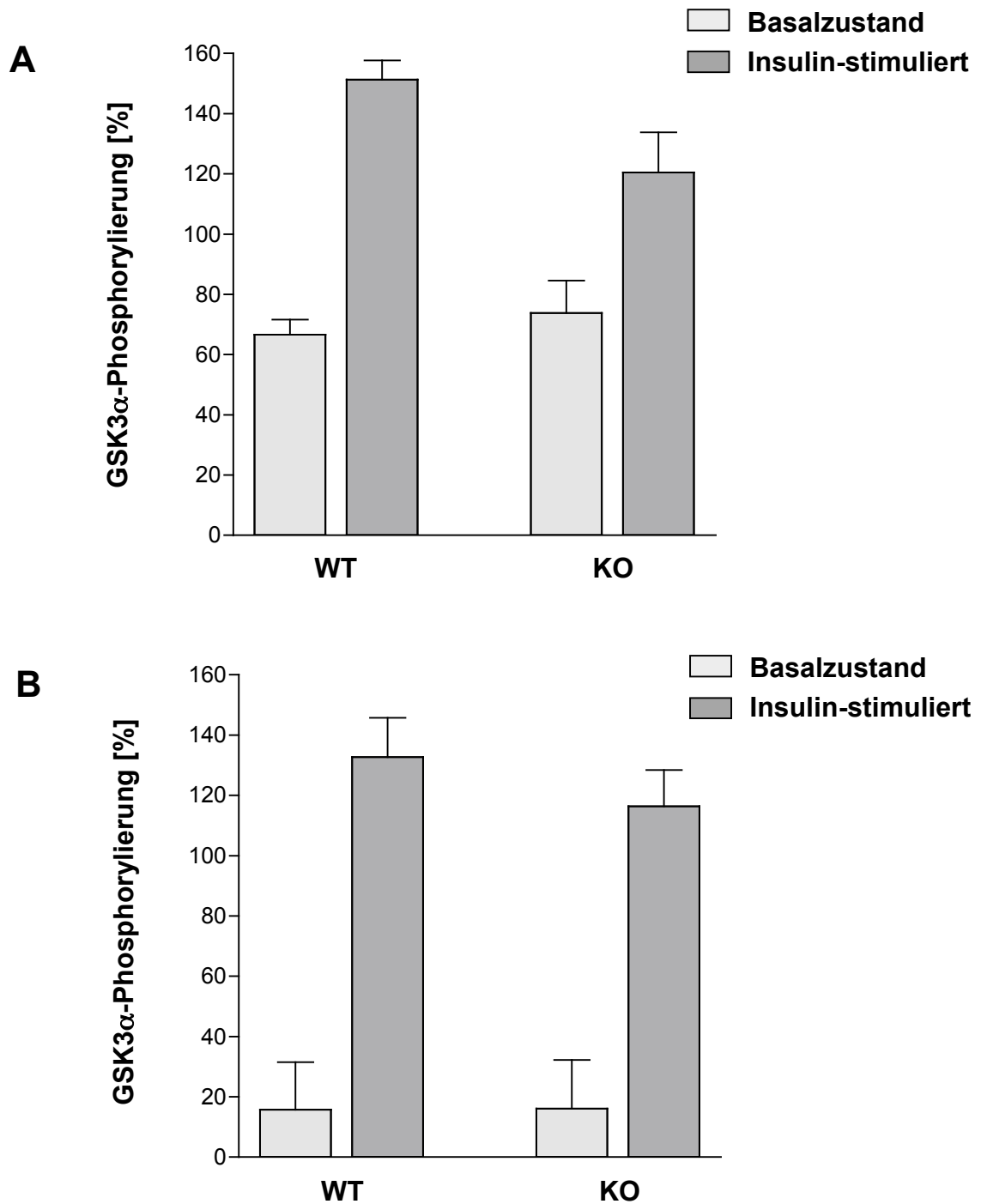
In Abb. 22 ist die Quantifizierung der GSK3 $\alpha$ -Phosphorylierung im Herzen der Wildtyp-Mäuse und Alox15-Knockout-Tiere dargestellt. Im Herzen der männlichen Wildtyp-Mäuse stieg die Phosphorylierung um das 2,2fache an ähnlich der Phosphorylierung im Herz der Alox15-Knockout-Mäuse, die um das 2,5fache anstieg. Im Herzen der weiblichen Tiere war der Anstieg der Phosphorylierung nach Insulinstimulus etwas höher: im Wildtyp stieg die Phosphorylierungsrate um das 6fache an, in der Alox15-Knockout-Maus um das 3,5fache.

Die Quantifizierung der GSK3 $\alpha$ -Phosphorylierung im Skelettmuskel ist in Abb. 23 dargestellt. Im Skelettmuskel der männlichen Wildtyp-Mäuse zeigt sich eine 2,3fache Steigerung der Phosphorylierung nach Insulinstimulus, bei den Alox15-Knockout-Mäusen eine 1,7fache Steigerung. Die Skelettmuskel der weiblichen Tiere zeigen eine stärkere Phosphorylierung, nachdem Insulin injiziert wurde. Bei den Wildtyp-Mäusen steigt sie um das 9fache an, bei den Alox15-Knockout-Tieren um das 8fache. Es wurden keine signifikanten Unterschiede in der GSK $\alpha$ -Phosphorylierung im Skelettmuskel von Wildtyp- und Alox15-Knockout-Mäusen gefunden.



**Abb. 22 Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\alpha$ -Phosphorylierung im Herzen**

Darstellung der Quantifizierung der Western Blots als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten Werte von  $n=4-6$  einzelnen Tieren. **A.** Männliche Tiere. **B.** Weibliche Tiere ungepaarter  $t$ -test

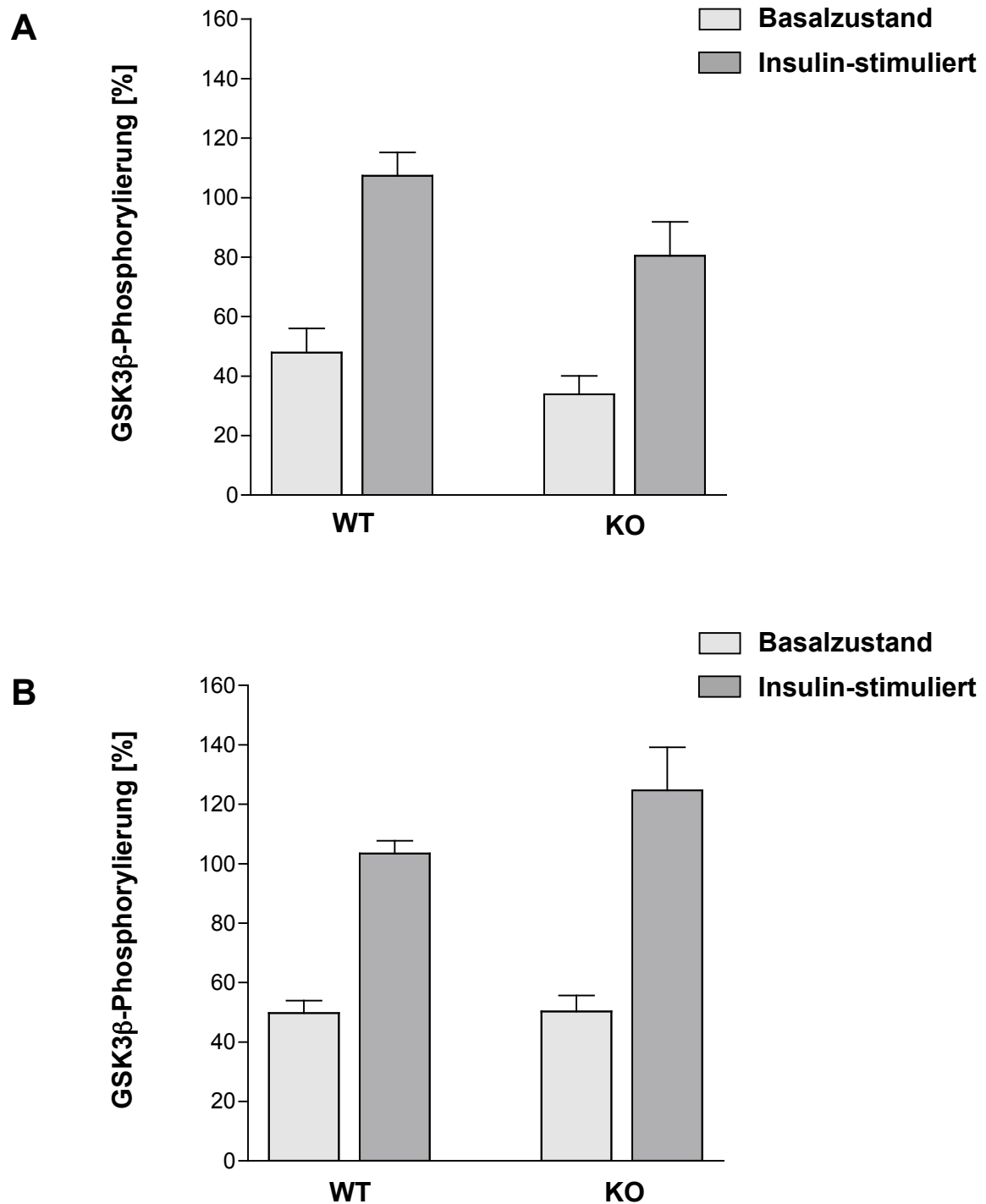


**Abb. 23** Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\alpha$ -Phosphorylierung im Skelettmuskel

Darstellung der Quantifizierung der Western Blots als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten Werte von  $n=3-5$  einzelnen Tieren. **A.** Männliche Tiere. **B.** Weibliche Tiere ungepaarter  $t$ -test

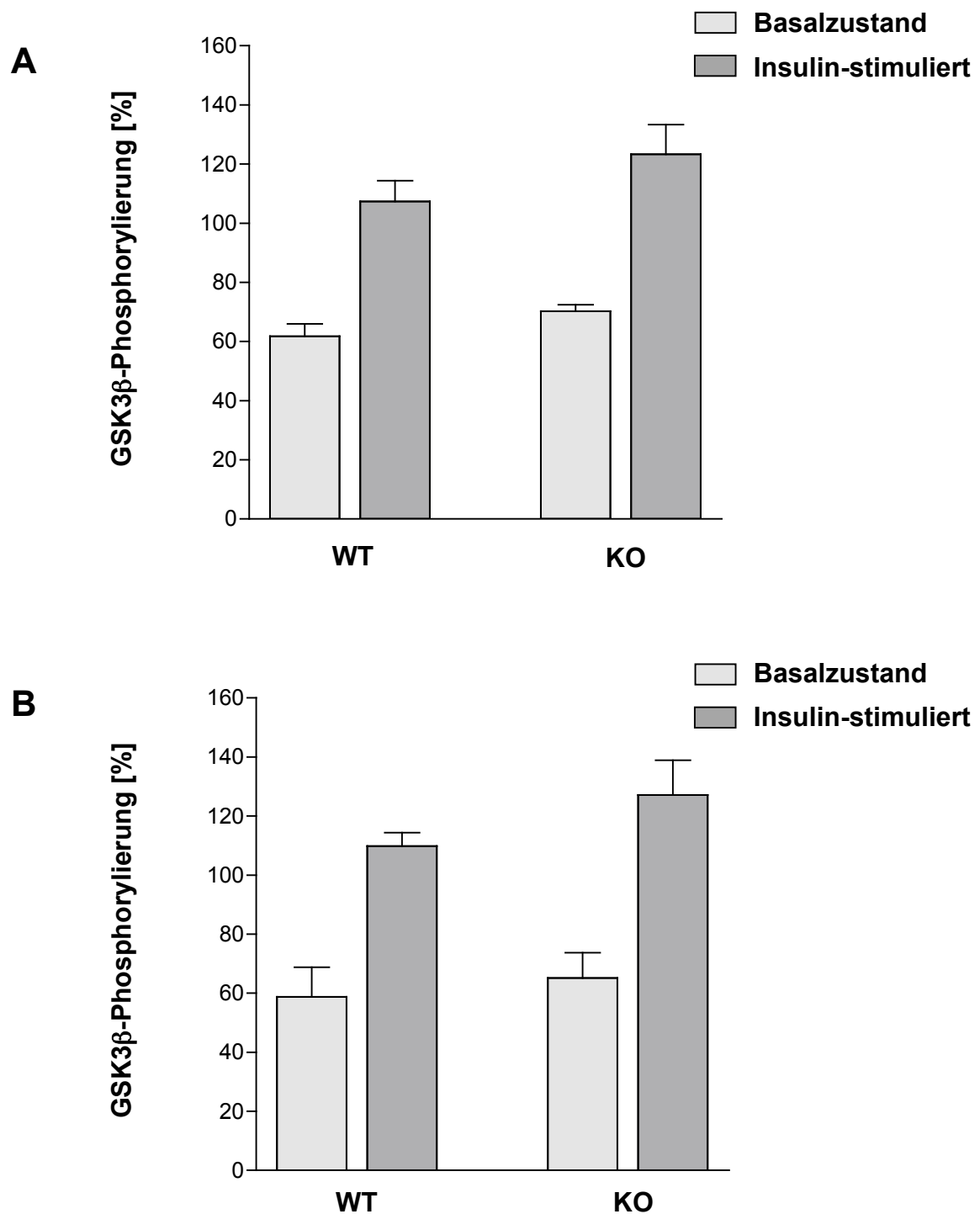


Die Quantifizierung der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung im Herzen ist in Abb. 24 dargestellt. Die Phosphorylierung der GSK3 $\beta$  im Basalzustand ist bei Wildtyp-Mäusen sowie Alox15-Knockout-Tieren gleich hoch. Im Insulin-stimulierten Herzen zeigt sich ein Anstieg der Phosphorylierung um das 2fache bei den männlichen Tieren (Abb. 24A). Bei den weiblichen Tieren (Abb. 24B) steigt die GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung im Insulin-stimulierten Herzen der Wildtyp-Mäusen um das 2fache an, bei den Alox15-Knockout-Tieren um das 2,5fache. Es zeigen sich keine signifikanten Unterschiede zwischen Wildtyp- und Knockout-Maus. In Abb. 25 ist die Quantifizierung der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung in Skelettmuskel dargestellt. Im Insulin-stimulierten Skelettmuskel steigt die GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung um bei männlichen Wildtyp- und Alox15-Knockout-Tieren um das 1,8fache an. Bei den weiblichen Wildtyp-Mäusen steigt die Phosphorylierung ebenfalls um das 1,8fache an, im Skelettmuskel der Knockout-Tiere um das 1,9fache. Somit zeigt die Phosphorylierungsrate der GSK3 $\beta$  in Herz sowie Skelettmuskel von Wildtyp- und Knockout-Tieren bei beiden Geschlechtern keinen signifikanten Unterschied.



**Abb. 24** Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung im Herzen

Darstellung der Quantifizierung der Western Blots als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten Werte von  $n=4-6$  einzelnen Tieren. **A.** Männliche Tiere. **B.** Weibliche Tiere ungepaarter  $t$ -test



**Abb. 25 Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung im Skelettmuskel**

Darstellung der Quantifizierung der Western Blots als Mittelwerte ( $\pm$  SEM) der absoluten Werte von  $n=4-5$  einzelnen Tieren. **A.** Männliche Tiere. **B.** Weibliche Tiere ungepaarter  $t$ -test



## 4. DISKUSSION

Es ist schon seit längerer Zeit bekannt, dass eines der charakteristischen Merkmale des Diabetes mellitus Typ 2 eine gestörte GLUT4-Translokation ist, die zu einer verminderten Glukoseaufnahme in die Zelle und somit zur Hyperglykämie führt (GARVEY et al., 1998; GALUSKA et al., 1998). Allerdings ist immer noch unklar wie die GLUT4-Translokation in der Zelle detailliert vonstatten geht und durch welche Faktoren sie beeinflusst wird. Erwiesen ist eine Beteiligung des Aktinzytoskeletts am Transport des GLUT4 zur Plasmamembran (TSAKIRIDIS et al., 1994; TSAKIRIDIS et al., 1997; OMATA et al., 2000). Weitere Arbeiten weisen einen Einfluss der 12/15-Lipoxygenase bzw. ihrer Metaboliten (12-HETEs) an der GLUT4-Translokation durch Beteiligung am Aufbau des Aktinfilament-Netzwerkes nach (RICE et al., 1998; DRANSFELD et al., 2001).

Die dieser Arbeit zugrunde liegenden Überlegungen basieren u.a. auf den Untersuchungen des Glukosetransportes in Kardiomyozyten von DRANSFELD et al. (2001). Wie schon im Schrifttum Erwähnung fand, wurde in dieser Arbeit eine Beteiligung der 12-HETEs an der Anordnung des Aktinfilament-Netzwerkes und somit an der Insulin-induzierten Translokation des GLUT4 nachgewiesen. Um die physiologische Relevanz der in einer Zellkultur gewonnenen Ergebnisse festzustellen, wurden weitere Analysen in physiologischer Umgebung benötigt. Um dies durchzuführen war es erforderlich, die Funktion der 12/15-Lipoxygenase bzw. der 12-HETEs in einer 12/15-Lipoxygenase-Knockout-Maus zu untersuchen.

Das Ziel dieser Dissertationsarbeit war die Charakterisierung der Alox15-Knockout-Maus im Hinblick auf die Entwicklung von Defekten in der Insulinsignaltransduktion und der GLUT4-Translokation. Dabei standen die Untersuchungen bedeutender Signalproteine wie Akt und GSK3 sowie des Transporterproteins GLUT4 im Vordergrund. Die Ergebnisse wurden einerseits als Charakterisierung der Alox15-Knockout-Maus auf molekularer Ebene im Hinblick auf den Einfluss der 12/15-Lipoxygenase auf Elemente der Insulinsignalkaskade gewertet. Andererseits stellte sich die Frage, ob durch eine Störung der GLUT4-Translokation in den Knockout-Tieren eine Insulinresistenz entwickelt wurde.

## 4.1 Vorteile eines Knockout-Mausmodells gegenüber kultivierten Zelllinien

Bei der experimentellen Arbeit mit Tieren stellt sich immer die Frage nach der Relevanz und Erfordernis dieser Versuche. Da es sich um den Einsatz lebender Wesen handelt, ist hier eine genaue Überprüfung der Notwendigkeit zwingend.

Zellkultur und *in vitro* Systeme sind Methoden, die es ermöglichen, Untersuchungen unter Ausschaltung störender, nicht kalkulierbarer Einflüsse und unter Beschränkung auf einen molekularen Vorgang durchzuführen. Dies ist in zahlreichen Fällen eine gängige und erfolgsversprechende Methode. Häufig ist es aber notwendig, bestimmte Funktionsstörungen in einer möglichst physiologischen Umgebung zu untersuchen. Im Gegensatz zu einem Tiermodell ist es mit den o.g. Systemen nicht möglich, Bedingungen, die in einem Gesamtorganismus herrschen zu imitieren. Höhere Lebewesen zeichnen sich dadurch aus, dass sie aus einer Vielzahl verschiedenster Zelltypen bestehen, die alle definierte, unterschiedliche Funktionen besitzen und miteinander interagieren, sich gegenseitig beeinflussen und kontrollieren. Aus diesem Grund ist es immer erforderlich, im Zellsystem gewonnene Daten in einem intakten Organismus zu überprüfen. Einige Erkenntnisse, die an isolierten Zellen gewonnen wurden, konnten z.B. im Lysat der entsprechenden intakten Gewebe nicht bestätigt werden (RUAN et al., 2003). Dies liegt u.a. daran, dass spezifische Wechselwirkungen nur in einem vollständigen Gewebe stattfinden können und in einem Zellkultursystem hingegen nur eingeschränkt funktionieren.

Ein Beispiel sind kultivierte Skelettmuskelzellen, in denen die Antwort auf einen Insulinstimulus um ein vielfaches geringer ist, als im intakten Muskel. Dies liegt vermutlich an der fehlenden Innervation in isolierten Zellen, die zu einer verminderten Aktivität im Skelettmuskel führt (PLOUG und RALSTON, 2002). Für die Untersuchung zahlreicher pathophysiologischer Vorgänge ist ein physiologisches System in seiner Gesamtheit zwingend notwendig, u.a. da es bei Defekten auf molekularer Ebene häufig Kompensationsmechanismen entstehen, die in einem isolierten Zellsystem nicht zustande kommen können.

Will man die molekularen Hintergründe der Funktion eines Organismus und deren Versagen in pathologischen Vorgängen verstehen, so ist man letztendlich immer darauf angewiesen, eine Fragestellung im Kontext des gesamten Lebewesens anzugehen (PAIGEN, 2003).

Als geeignetes Modell hat sich aus verschiedenen Gründen die Maus erwiesen. Es wurde festgestellt, dass zwischen den Genen von Mensch und Maus eine mehr als 99 %ige Homologie besteht. Aufgrund dieser Tatsache verfügt sie über ein nahezu vollständig charakterisiertes Genom (LEITER, 2002). Da sich die zugrundeliegenden Prinzipien auf molekularer Ebene während der Evolution nur geringfügig verändert haben, lassen sich zahlreiche Erkenntnisse auf das menschliche Genom übertragen (PAIGEN, 2003).

Ein weiterer Vorteil eher praktischer Art ist die schnelle und zahlreiche Fortpflanzung der Tiere (3-6 Würfe pro Jahr mit einer Wurfgröße von ca. 4-8 Tieren) und die Möglichkeit innerhalb enger Verwandtschaftsbeziehungen Tiere zu kreuzen. Da die Maus bereits im Alter von ca. 45 Tagen geschlechtsreif wird, ist es ohne großen Aufwand möglich, auch Untersuchungen an adulten Tieren durchzuführen. Von nicht zu unterschätzender Bedeutung sind auch die geringen Anschaffungskosten sowie die relativ unkomplizierte und platzsparende Haltung.

Um Mäuse mit einem gezielt ausgeschalteten Gen zu erhalten, wird exogene DNA, die ein mutiertes Allel des untersuchten Gens trägt, durch Transfektion in embryonale Stammzellen übertragen. Nun können mit positiver und negativer Selektion die Zellen erfasst werden, in denen eine homologe Rekombination stattgefunden hat. Diese Zellen werden in eine Blastocyste injiziert, die in eine pseudoträchtige Maus übertragen wird. Durch Kreuzung von Mäusen, die für das ausgeschaltete Allel heterozygot sind, werden schließlich Nachkommen gezeugt, die für die Ausfallmutation homozygot sind (LODISH et al., 2001).

Zahlreiche wichtige und grundlegende Erkenntnisse zur Aufklärung der molekularen Mechanismen physiologischer und pathologischer Vorgänge im Zusammenhang mit Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 wurden mit Hilfe genetisch modifizierter Tiermodelle gewonnen (MAUVAIS-JARVIS et al., 2002; KAHN, 2003).

1996 konnte z.B. die entscheidende Rolle des Insulinrezeptors mit Hilfe einer IR-Knockout-Maus endgültig nachgewiesen werden (ACCILI et al., 1996; JOSHI et al., 1996). Die Erkenntnisse, die durch die IRS1- (ARAKI et al., 1994; TAMEMOTO et al., 1994) und die IRS2-Knockout-Maus (WITHERS et al., 1998; KUBOTA et al., 2000) gewonnen wurden, haben wesentlich zum Verständnis der Bedeutung dieser Proteine und der Insulinsignalkaskade beigetragen. Die Phänotypen dieser Knockout-Modelle, die nur geringgradige Veränderungen oder einen manifestierten Diabetes mellitus Typ 2 aufwiesen, haben entscheidend zum Verständnis der Entstehung der Insulinresistenz und  $\beta$ -Zelldysfunktion sowie der allgemeinen Pathogenese des Diabetes mellitus Typ 2 beigetragen. Insbesondere angesichts der komplexen Pathophysiologie des Diabetes mellitus Typ 2 und seiner multifaktoriellen Ätiologie ist es notwendig, *in vitro* gewonnene Hypothesen mit Hilfe eines lebenden Organismus zu verifizieren bzw. zu widerlegen (MAUVAIS-JARVIS und KAHN, 2000; LEITER, 2002).

Sicherlich müssen Erkenntnisse, die mit Hilfe eines Knockout-Modells gewonnen werden, differenziert beurteilt werden. Obwohl die Homologie des Genoms von Mensch und Maus hoch ist, sind beide Spezies bezüglich ihrer biologischen Eigenschaften unterschiedlich. Bei der Untersuchung grundlegender pathogenetischer Mechanismen auf molekularer Ebene können Erkenntnisse im gewissen Maße von der Maus auf den Menschen übertragen werden. Allerdings muss berücksichtigt werden, dass es sich hier um einzelne Individuen handelt, die endogenen und exogenen Einflüssen unterliegen, die nicht alle kontrollierbar sind. Aufgrund der individuellen Schwankungen ist es notwendig, eine ausreichende Anzahl an Versuchstieren zu verwenden und die Ergebnisse dementsprechend zu bewerten.



## 4.2 Die Alox15-Knockout-Maus

Das Alox15-Knockout-Mausmodell wurde 1996 von SUN und FUNK generiert. Mittlerweile existieren zahlreiche Veröffentlichungen über Untersuchungen, die an diesem Knockout-Modell vorgenommen wurden (BLEICH et al., 1999; MILLER et al., 2001; HAN et al., 2002; KIM et al., 2003; REDDY et al., 2003; WALTERS et al., 2003). In diesen und anderen Arbeiten wurde nur vereinzelt ein Zusammenhang zum Diabetes mellitus oder zur Insulinresistenz hergestellt. Im Rahmen dieser Arbeit wurde die Alox15-Knockout-Maus erstmals im Hinblick auf ihre Bedeutung bei der Pathogenese von Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2 auf molekularer Ebene untersucht. Um eine vollständige Charakterisierung des Knockout-Mausmodells vornehmen zu können, wurden in der vorliegenden Arbeit sowohl männliche als auch weibliche Tiere verwendet.

Die Alox15-Knockout-Mäuse, die als Zuchtpaare dienten, zeigten hinsichtlich ihres äußeren Erscheinungsbildes und ihrer Konstitution keine Unterschiede zum Wildtyp. Die nachfolgende F1-Generation unterschied sich ebenfalls nicht von Mäusen des Wildtyps. Der überwiegende Teil der Nachkommen war lebensfähig und entwickelte sich unauffällig und normgerecht. Auch Konstitution und Körpergewicht der adulten Alox15-Knockout-Mäuse waren vergleichbar mit denen der Wildtyp-Mäuse. Diese Befunde bestätigen die Beobachtungen von SUN und FUNK, die das Alox-15-Knockout-Mausmodell 1996 generierten.

In der vorliegenden Arbeit wurden ausschließlich Herz und Skelettmuskel der Hintergliedmaßen der Tiere verwendet. Als Ausgangspunkt für die Wahl der Gewebe waren verschiedene Kriterien von Relevanz. Sowohl Skelettmuskel als auch Herz gehören neben dem Fettgewebe zu den insulinsensitiven Geweben (CZECH et al., 1999; HOLMAN und SANDOVAL, 2001; RUDICH und KLIP, 2003), in denen GLUT4 überwiegend exprimiert wird (JAMES et al., 1988; BIRNBAUM, 1989; CHARRON et al., 1989; FUKUMOTO et al., 1989). Zahlreiche Veröffentlichungen zum Thema Diabetes mellitus Typ 2 und Insulinresistenz basieren auf Untersuchungen an Skelettmuskelzellen.

Da nach Insulinstimulus der größte Teil der Glukoseaufnahme im Skelettmuskel stattfindet (ca. 80 %), stellt er ein geeignetes Modell für die Untersuchung der GLUT4-Translokation dar (KOISTINEN und ZIERATH, 2002).

Die vorliegenden Untersuchungen basieren u.a. auf den Veröffentlichungen von DRANSFELD et al. 2000 und 2001, die für ihre Versuche kultivierte Kardiomyozyten der Ratte eingesetzt haben. Aufgrund dieser Untersuchungen und da die Mechanismen der Glukoseaufnahme in Herz und Skelettmuskel sehr ähnlich ablaufen, wurden beide Gewebe verwendet (ABEL, 2004).

### 4.3 Einfluss der 12/15-Lipoxygenase auf die GLUT4-Expression

Im Basalzustand befindet sich GLUT4 vorwiegend in intrazellulären Vesikeln, in denen er erst durch die Insulinwirkung zur Plasmamembran transportiert wird, um dort die Glukoseaufnahme zu ermöglichen. Für diese GLUT4-Translokation ist ein Aktin-filament-Netzwerk erforderlich (TSAKIRIDIS et al., 1994; MARTIN et al., 1996; TSAKIRIDIS et al., 1997; OMATA et al., 2000; KANZAKI und PESSIN, 2001; BROZINICK et al., 2004).

In der vorliegenden Arbeit konnte in Herz und Skelettmuskel der Alox15-Knockout-Tiere eine deutliche und unveränderte GLUT4-Expression im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 9). Der GLUT4-Gehalt ist sowohl im Herzen als auch im Skelettmuskel der männlichen und weiblichen Tiere unverändert (Abb. 10). Dies bestätigt die Ergebnisse der Arbeit von DRANSFELD (2001), in der ebenfalls keine Veränderung der GLUT4-Expression im Totallysat von Esculetin-behandelten Kardiomyozyten festgestellt werden konnte. Dieses Ergebnis lässt vermuten, dass die 12/15-Lipoxygenase keinen Einfluss auf die GLUT4-Expression hat und die Knockout-Tiere aufgrund des unveränderten GLUT4-Gehaltes in der Lage wären, Glukose in die Zelle aufzunehmen.

Da der gesamte Muskel ohne Trennung der zellulären Kompartimente lysiert wurde, kann keine Aussage darüber gemacht werden, ob die Verteilung von GLUT4 im Skelettmuskel und Herzen von Knockout-Tieren im basalen und Insulin-stimulierten Zustand unverändert ist.

---

Die unveränderte GLUT4-Expression in den Knockout-Tieren lässt keine Rückschlüsse auf eine funktionierende GLUT4-Translokation ziehen, da kein Hinweis auf die Lokalisation der Transporter gegeben wird. Ob der Verlust der 12/15-Lipoxygenase eine Wirkung auf den Transport von GLUT4 zur Plasmamembran hat, müsste in weiteren Versuchen untersucht werden. Um die Verteilung des GLUT4 in der Zelle nach Insulingabe festzustellen wäre eine Membran-Fraktionierung erforderlich.

## 4.4 Bedeutung der 12/15-Lipoxygenase für Elemente der Insulinsignalkaskade

### 4.4.1 Einfluss der 12/15-Lipoxygenase auf Expression und Phosphorylierung von Akt

Die Proteinkinase Akt spielt eine essentielle Rolle in der Insulinsignalkaskade und der Stimulation des Glukosetransportes und somit auch in der GLUT4-Translokation (KOHN et al., 1996). Es existieren drei Isoformen der Akt (Akt1, Akt2, Akt3), die unterschiedlich hoch exprimiert werden (COFFER et al., 1998). Nach Insulinstimulus wird Akt über Insulinrezeptorsubstrate, PI3K und PDK1 phosphoryliert (HAJDUCH et al., 2001). Dies führt zu einer Phosphorylierung der GSK3 und somit zu einer erhöhten Glykogensynthese und zu einer Aktivierung bzw. Erhöhung der GLUT4-Translokation (KOHN et al., 1996; UEKI et al., 1998).

In der vorliegenden Arbeit konnte die Akt-Expression im Herzen der Wildtyp-Mäuse und der Alox15-Knockout-Mäuse bei beiden Geschlechtern proteinbiochemisch nachgewiesen werden (Abb. 11). Hier zeigten sich weder signifikante Unterschiede zwischen Wildtyp und Knockout, noch zwischen männlichen und weiblichen Tieren (Abb. 12). Im Skelettmuskel der weiblichen Alox15-Knockout-Tiere war ebenfalls keine Veränderung der Akt-Expression erkennbar (Abb. 12B). Lediglich die Skelettmuskel der männlichen Alox15-Knockout-Tiere wiesen eine signifikante Verminderung der Akt-Expression mit  $p = 0,05$  im Vergleich zum Wildtyp auf (Abb. 12A). Somit konnte im Skelettmuskel eine geschlechtsspezifische Verminderung der Akt-Expression festgestellt werden.

Bisher existieren noch keine Daten über geschlechtsspezifische Unterschiede bei der Expression der Akt. Dies kann auch daran liegen, dass zu einem großen Teil nur männliche Tiere für Versuche verwendet werden und so ein Vergleich nicht möglich ist. Weitere Untersuchungen auf Grundlage dieses Ergebnis müssten durchgeführt werden, um die Relevanz der Daten zu überprüfen.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine veränderte Akt-Phosphorylierung in Herz und Skelettmuskel der Insulin-stimulierten Alox15-Knockout-Tiere im Vergleich zum Wildtyp nachgewiesen werden (Abb. 13-16). Diese Beobachtung konnte sowohl bei männlichen als auch bei weiblichen Tieren gemacht werden. Damit kann die Aussage von DRANSFELD et al. (2001), der keine Auswirkung der 12/15-Lipoxygenase-Inhibition auf die Akt-Phosphorylierung feststellen konnte, bestätigt werden. Es ist daher anzunehmen, dass der Verlust der 12/15-Lipoxygenase keine Störungen der Insulinsignaltransduktion auf dieser Ebene in den untersuchten Geweben der Alox15-Knockout-Mäuse verursacht.

Es gibt Hinweise, dass die Akt ebenfalls über das Aktinfilament-Netzwerk zur Plasmamembran transportiert wird, um dort phosphoryliert zu werden. PEYROLIER et al. (2000) zeigten in verschiedenen Zellmodellen (L6 Myotubes, HEK293, 3T3-L1 Adipozyten) eine Verminderung der Akt-Phosphorylierung in Zellen mit zerstörtem Aktinzytoskelett. Da in der vorliegenden Arbeit in Herz und Skelettmuskel der Alox15-Knockout-Mäuse keine Veränderung der Akt-Phosphorylierung festgestellt wurde, könnte dies als Hinweis für ein intaktes Aktinfilament-Netzwerk gedeutet werden. Dagegen sprechen die Daten von DRANSFELD et al. (2001), die durch einen Inhibitor der 12/15-Lipoxygenase eine Auflösung des Aktinfilament-Netzwerkes in kultivierten Kardiomyozyten herbeiführen und eine unveränderte Akt-Expression sowie Phosphorylierung feststellen konnten; wie auch KANZAKI und PESSIN (2001) in Adipozyten. BROZINICK et al. (2004) konnten erstmalig eine gestörte GLUT4-Translokation und Glukoseaufnahme bei unveränderter Akt-Phosphorylierung in mit Latrunculin B behandeltem Skelettmuskel der Ratte feststellen. Diese Ergebnisse sprechen dafür, dass die unveränderte Akt-Aktivierung in den Alox15-Knockout-Tieren keine Aussage über das Intaktsein des Aktinzytoskeletts zulässt. Es wäre möglich, dass Akt und GLUT4 über unterschiedliche Wege zur Plasmamembran transportiert werden und die Depolymerisation des Aktinfilament-Netzwerkes keinen signifikanten Einfluss auf die Aktivierung von Akt hat.

Zwar ist bekannt, dass die Aktivierung von Akt über ein Aktinfilament-Netzwerk geschieht (HAJDUCH et al., 2001; LAWLOR und ALESSI, 2001); die genauen Vorgänge sind allerdings noch unklar. Somit kann die unveränderte Akt-Phosphorylierung nicht als Indiz für ein intaktes Aktinfilament-Netzwerk dienen.

#### 4.4.2 Einfluss der 12/15-Lipoxygenase auf Expression und Phosphorylierung von GSK3

GSK3 ist eine Proteinkinase, die in unstimulierten Zellen aktiv ist und zur Phosphorylierung und Inhibition der Glykogensynthase und somit zur verminderten Synthese von Glykogen führt (HAJDUCH et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002; DOBLE und WOODGETT, 2003). Es existieren zwei verschiedene Isoformen, GSK3 $\alpha$  und GSK3 $\beta$  (FRAMEN und COHEN, 2001). Beide werden nach Insulinstimulus durch Akt phosphoryliert und damit deaktiviert, was zu einer Stimulation der Glykogensynthase führt und damit zu einer erhöhten Synthese von Glykogen (HAJDUCH et al., 2001; MARTINEZ et al., 2002; DOBLE und WOODGETT, 2003).

Um die genaue Wirkungsweise bzw. den Wirkungsort der 12/15-Lipoxygenase einschränken zu können, wurde sowohl die Expression als auch die Phosphorylierung von GSK3 in der vorliegenden Arbeit untersucht. Die GSK3-Expression konnte proteinbiochemisch in Herz und Skelettmuskel der männlichen und weiblichen Alox15-Knockout-Tiere nachgewiesen werden (Abb. 17). Es konnten keine signifikanten Veränderungen der Expressionsstärke unabhängig vom Geschlecht im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden (Abb. 18-19). Die Phosphorylierung der GSK3 nach Insulinstimulus konnte ebenfalls in beiden Geweben von Alox15-Knockout-Tieren ohne signifikante Unterschiede im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden (Abb. 20-25)

Diese Ergebnisse zeigen, dass der Verlust der 12/15-Lipoxygenase keinen Einfluss auf die GSK3-Phosphorylierung hat und geben einen weiteren Hinweis darauf, dass die Insulinsignalkaskade in den Alox15-Knockout-Tieren ungestört ist. Diese Daten bestätigen und vervollständigen die Ergebnisse der Untersuchung der Akt-Phosphorylierung, da GSK3 der Akt direkt nachgeschaltet ist.

#### 4.5 Entwicklung einer Insulinresistenz in der Alox15-Knockout-Maus?

DRANSFELD et al. (2001) haben kultivierte Kardiomyozyten verwendet, in denen die 12/15-Lipoxygenase für eine geringe Zeit gehemmt wurde, um die direkten Auswirkungen auf das Aktinfilament-Netzwerk, die GLUT4-Translokation und die Insulinsignalkaskade zu untersuchen. Da in dieser Arbeit eine vollständige Hemmung der Insulin-induzierten Glukoseaufnahme durch Inhibierung der 12/15-Lipoxygenase festgestellt wurde, konnte man vermuten, dass auch in der Alox15-Knockout-Maus das Aktinfilament-Netzwerk desorganisiert und damit die GLUT4-Translokation gestört ist. SUN und FUNK (1996) stellten fest, dass in peritonealen Makrophagen der Alox15-Knockout-Maus nur noch ein nicht-detektierbarer Gehalt an 12- und 15-HETEs vorhanden ist. Dieser Befund lässt vermuten, dass in Herz und Skelettmuskel der Alox15-Knockout-Maus der 12- und 15-HETE-Gehalt ebenfalls so gering sein sollte, so dass es -wie bei DRANSFELD et al. (2001) beschrieben- zu einer verminderten Glukoseaufnahme kommt.

Es gilt als erwiesen, dass eine gestörte Glukoseaufnahme eine periphere Insulinresistenz auslösen und letztendlich zur Ausbildung eines Diabetes mellitus Typ 2 führen kann (CLINE et al., 1999). Bei den Untersuchungen am Alox15-Knockout-Mausmodell stellt sich also die Frage, ob das Fehlen der 12/15-Lipoxygenase von Beginn der Entwicklung eine gestörte GLUT4-Translokation bewirkt und diese zu einer peripheren Insulinresistenz führt oder dieser Gendefekt kompensiert wird. Deshalb war ein Ziel der vorliegenden Arbeit, die Auswirkungen des ausgeschalteten Alox15-Gens im Gesamtorganismus im Hinblick auf Anzeichen einer Insulinresistenz zu untersuchen.

#### 4.5.1 Plasmaglukosespiegel

Der Plasmaglukosespiegel ist bei einem manifestierten Diabetes mellitus Typ 2 sowohl im nüchternen als auch im postprandialen Zustand erhöht. Aus diesem Grund wird der Diabetes mellitus Typ 2 beim Menschen u.a. über den Nachweis einer chronischen Hyperglykämie diagnostiziert. Die Referenzwerte befinden sich bei der Maus zwischen 5,94 und 10,56 mmol/l (VISSER, 2001). Als Einschlusskriterium für eine diabetische Stoffwechsellage wird ein postprandialer Blutglukosewert  $> 11$  mmol/l angesehen (SCHMITZ, 2003). In der vorliegenden Arbeit wurde Wildtyp-Mäusen sowie Alox15-Knockout-Tieren im Basalzustand bzw. nach Insulinstimulus Blut entnommen und der Plasmaglukosespiegel gemessen (Abb. 8). Es konnte ein unveränderter basaler Plasmaglukosespiegel der Alox15-Knockout-Tiere im Vergleich zum Wildtyp gezeigt werden. Der überwiegende Teil der Werte bewegte sich innerhalb der o.g. Norm. Einzelne Werte sowohl von Knockout-Mäusen als auch von Wildtyp-Mäusen, zeigten höhere Glukosespiegel als 11 mmol/l (ca. 12-16 mmol). Da es sich nur um eine sehr geringe Erhöhung handelt, die sowohl bei Alox15-Knockout-Tieren wie auch beim Wildtyp und beiden Geschlechtern vorgekommen ist, kann man von einer physiologischen kurzfristigen Anhebung des Blutglukosespiegels ausgehen. Dafür spricht auch, dass die Plasmaglukosespiegel diabetischer Mäuse deutlich über 11 mmol/l, bei ca. 37 mmol/l liegen (SCHMITZ, 2003). Weiterhin befanden sich die Tiere kurz vor der Blutentnahme in einer Stressituation, die ebenfalls zu einer leichten Erhöhung der Blutglukose führen kann. Keiner der Werte, die im Basalzustand gemessen wurden, lag unterhalb der unteren Grenze von 5,94 mmol/l. Anhand der gemessenen Plasmaglukosewerte lässt sich eine Insulinresistenz nicht ausschließen, da diese sich schon lange bevor klinisch erfassbare Symptome auftreten, entwickelt (SHULMAN, 2000; GOLDSTEIN, 2003). Die Manifestation eines Diabetes mellitus Typ 2 kann hingegen relativ sicher ausgeschlossen werden, da in diesem Falle der Plasmaglukosespiegel erhöht wäre. Dafür spricht, dass die Tiere keinerlei klinische Symptome wie Polyurie, Polydipsie oder Glukosurie aufweisen.



Im gesunden Organismus führt ein Insulinstimulus zu einer Erniedrigung des Blutglukosespiegels. Eine Insulinresistenz führt zu einer verminderten Wirkung des Insulins und somit zu keinem bzw. einem geringeren Abfall des Plasmaglukosespiegels. Nach einer Insulinstimulation wurde den Tieren Blut entnommen. Hier konnte sowohl bei den Wildtyp-Mäusen als auch beim Knockout eine Erniedrigung der Plasmaglukose nach Insulinstimulus nachgewiesen werden. Lediglich bei den männlichen Alox15-Knockout-Tieren war eine tendenziell etwas geringere Abnahme vorhanden. Da dieser Unterschied zum Wildtyp nicht signifikant war, kann über die Bedeutung dieses Ergebnisses keine eindeutige Aussage gemacht werden. Ob es sich eventuell um Anzeichen einer Insulinresistenz handeln könnte, müsste durch weitergehende Untersuchungen verifiziert werden. Man könnte vermuten, dass die verringerte Abnahme der Plasmaglukose der männlichen Knockout-Tiere im Zusammenhang mit der verminderten Akt-Expression steht. Dagegen spricht allerdings, dass der Grad der Akt-Phosphorylierung unverändert zum Wildtyp ist. Aufgrund der Tatsache, dass hier einzelne Individuen untersucht wurden und äußere Einflüsse wie z.B. Stress eine Erhöhung des Glukosespiegel verursachen können, ist zu vermuten, dass es sich eher um eine physiologische Schwankung handelt.

In der vorliegenden Arbeit konnte eine Ansprechbarkeit auf einen Insulinstimulus in den Alox15 Knockout-Tieren nachgewiesen werden. Dies gibt Anlass zu der Vermutung, dass die Tiere keine Insulinresistenz entwickelt haben. Definitiv ist eine Insulinresistenz aber nicht auszuschließen, da sie sich in einem sehr frühen Stadium befinden könnte, das noch keine messbaren Auswirkungen zeigt.

#### 4.5.2 GLUT4

In den Alox15-Knockout-Tieren konnte eine unveränderte GLUT4-Expression sowohl im Skelettmuskel als auch im Herzen festgestellt werden. Es ist anhand zahlreicher Untersuchungen davon auszugehen, dass die GLUT4-Expression im Skelettmuskel von diabetischen bzw. insulinresistenten Patienten im Vergleich zur Kontrolle nicht verändert ist (HANDBERG et al., 1990; PEDERSEN et al., 1990; KAHN et al., 1992).

Auch in der C57BL/KsJ-Lepr<sup>db/db</sup>-Maus -ein Mausmodell mit Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2- konnte keine Veränderung des Proteingehaltes von GLUT4 in Skelettmuskel und Fettgewebe nachgewiesen werden (SHAO et al., 2000). Ausschlaggebend für eine verminderte Glukoseaufnahme nach Insulinstimulus beim Diabetes mellitus Typ 2 ist also nicht ein verminderter GLUT4-Gehalt, sondern die fehlende bzw. verringerte Translokation des Transporters zur Plasmamembran. Diese gestörte GLUT4-Translokation konnte sowohl im Muskel von insulinresistenten als auch diabetischen Patienten und Nagetieren festgestellt werden (GARVEY et al., 1998; MIURA et al., 2001).

Die unveränderte GLUT4-Expression in den Alox15-Knockout-Tieren lässt daher keinen Rückschluss über die Ausbildung einer Insulinresistenz in den untersuchten Geweben zu. Es wäre daher wichtig, die Lokalisation von GLUT4 in der Zelle zu untersuchen. Dafür müsste eine Membran-Fraktionierung von insulinstimulierten Skelettmuskel und Herz durchgeführt werden, um die Verteilung des GLUT4 im Zellinneren und an der Plasmamembran zu erfassen.

#### 4.5.3 Akt und GSK3

Die Kinasen Akt und GSK3 spielen eine Schlüsselrolle in der Insulinsignalkaskade. Die Literatur gibt allerdings widersprüchliche Angaben zur Expression und Phosphorylierung von Akt im Muskel von insulinresistenten oder diabetischen Menschen sowie Nagern an. Eine unveränderte Akt-Expression bei verminderter Phosphorylierung im Skelettmuskel von Diabetes mellitus Typ 2 Patienten konnte von KROOK et al. (1998) nachgewiesen werden. Weitere Untersuchungen bestätigen eine unveränderte Akt-Expression. GOSMANOV et al. (2004) zeigten hingegen eine verminderte Expression der Akt in Muskeln von adipösen Patienten mit atypischem Diabetes. Nach diesen Untersuchungen ist zu vermuten, dass die einzelnen Isoformen (Akt1-3) unterschiedliche Relevanz für die Entwicklung einer Insulinresistenz haben.

In der vorliegenden Arbeit war die Akt-Expression lediglich im Skelettmuskel der männlichen Alox15-Knockout-Tieren signifikant vermindert. Dieses Ergebnis gibt keinen Hinweis auf eine Insulinresistenz, da bei einem Großteil der Untersuchungen beim Diabetes mellitus Typ 2 keine veränderte Akt-Expression gefunden wurde.

Um die Bedeutung dieses Ergebnisses zu beurteilen, müsste ein spezifischer Antikörper gegen die einzelnen Isoformen verwendet werden, da vermutlich Unterschiede der Expression bei Insulinresistenz bzw. Diabetes mellitus Typ 2 existieren. Da der Grad der Akt-Phosphorylierung allerdings nicht verändert ist, ist zu vermuten, dass die verminderte Akt-Expression keine Relevanz für die Weiterleitung des Insulinsignals hat.

Ebenfalls existieren unterschiedliche Hypothesen betreffend der Phosphorylierung von Akt beim Diabetes mellitus Typ 2 bzw. bei Insulinresistenz. SHAO et al. (2000) fanden eine verminderte Akt-Phosphorylierung und Aktivierung in Skelettmuskel sowie Fettgewebe von einem genetisch veränderten Mausmodell mit Adipositas, Insulinresistenz und Diabetes mellitus Typ 2. Das bestätigt die Untersuchungen von KROOK et al. (1998), die ebenfalls eine verminderte Akt-Phosphorylierung im diabetischen Skelettmuskel nachgewiesen haben. Bei den Alox15-Knockout-Tieren konnte in Herzen und Skelettmuskel keine verminderte Akt-Phosphorylierung im Vergleich zu den Wildtyp-Tieren festgestellt werden. Dies ist als weiterer Hinweis zu deuten, dass diese Tiere keine Insulinresistenz entwickelt haben.

Auch eine veränderte Expression und Phosphorylierung der GSK3 können Hinweise auf eine Insulinresistenz geben. NIKOULINA et al. fanden (2000), dass eine Erhöhung der Proteinlevel und der Aktivierung der GSK3 in einer reduzierten Aktivität der Glykogensynthese im Skelettmuskel von Diabetes mellitus Typ 2-Patienten resultiert. In der vorliegenden Arbeit konnte keine veränderte GSK3-Expression in Skelettmuskel und Herz der Alox15-Knockout-Tiere im Vergleich zum Wildtyp festgestellt werden. Der Grad der Phosphorylierung der GSK3 war ebenfalls in den männlichen und weiblichen Tieren ohne signifikanten Unterschied zum Wildtyp. Diese Ergebnisse geben ebenfalls keinen Hinweis auf die Entwicklung einer Insulinresistenz.

## 4.6 Fazit

Die vorliegenden Ergebnisse geben zahlreiche Hinweise, dass die Alox15-Knockout-Tiere keine Insulinresistenz entwickelt haben, obwohl eine endgültige Aussage mit diesen Daten nicht getroffen werden kann. Es ist aufgrund dieser Befunde zu vermuten, dass in der Alox15-Knockout-Maus spezifische Kompensationsmechanismen aktiviert wurden, um den Verlust der 12/15-Lipoxygenase auszugleichen. SUN und FUNK, die die Alox15-Knockout-Maus 1996 generierten, konnten in peritonealen Makrophagen der Knockout-Maus weder 12-HETEs noch 15-HETEs nachweisen. Ob dies in Herz und Skelettmuskel ebenso ist, ist nicht bekannt. Allerdings kann man davon nicht unbedingt ausgehen, da SUN und FUNK einzelne Zellen und keine komplexen Gewebe, die unterschiedliche Zelltypen enthalten, untersucht haben. Anhand der vorliegenden Ergebnisse könnte man vermuten, dass die 12- und 15-HETEs in den untersuchten Geweben vorkommen, da wir keine Veränderungen feststellen konnten. Es ist möglich, dass noch andere Isoformen der Lipoxygenase vorhanden sind, die die Produktion der 12-HETEs übernehmen. Dafür spricht, dass in der vorliegenden Arbeit auch in den Geweben der Alox15-Knockout-Maus bei Detektion mit dem 12/15-Lipoxygenase Antikörper das gleiche Bandenmuster wie beim Wildtyp festgestellt werden konnte. Da durch die Genotypisierung die Ausschaltung des Alox15-Gens nachgewiesen wurde, kann man vermuten, dass es sich hier um eng verwandte Isoformen der 12/15-Lipoxygenase handelt, die durch den Gebrauch eines polyklonalen Antikörpers nicht differenziert werden konnten. Um welche Isoformen es sich genau handelt, ist unklar. Man könnte annehmen, dass es sich um die 12-Lipoxygenase-Plättchenform handelt, die ebenfalls 12-HETEs produziert und eventuell die fehlende Produktion der 12/15-Lipoxygenase kompensiert. Es wäre deshalb erforderlich, die Gewebe nach weiteren Lipoxygenase-Isoformen sowie nach ihren Metaboliten (HETEs) zu untersuchen. Es könnte allerdings auch sein, dass die fehlenden 12-HETEs durch alternative Mechanismen ersetzt wurden. Dafür müssten weitere Untersuchungen hinsichtlich der Regulation des Aktinfilament-Netzwerkes gemacht werden.

Es ist auf jeden Fall wahrscheinlich, dass der Verlust der 12/15-Lipoxygenase durch einen Kompensationsmechanismus ersetzt bzw. vermindert wurde. Der Vorgang der Kompensation konnte in zahlreichen Untersuchungen mit Knockout-Mäusen festgestellt werden. Ein Beispiel im Bereich des Diabetes ist die GLUT4-Knockout-Maus: die homozygote GLUT4<sup>-/-</sup>-Knockout-Maus produziert kein GLUT4, zeigt aber nur eine leichte Insulinresistenz. Die heterozygote GLUT4<sup>+/-</sup>-Knockout-Maus, deren GLUT4-Expression im Gegensatz zum Wildtyp nur die Hälfte beträgt, entwickelt Insulinresistenz und letztendlich einen Diabetes mellitus Typ 2 (KATZ et al., 1995; STENBIT et al., 1997). Man vermutet, dass der vollständige Verlust des GLUT4 Proteins im Stoffwechsel der Maus die Produktion eines noch unbekannten Glukosetransporters auslöst, wohingegen diese Kompensationsmechanismen in der heterozygoten Maus nicht aktiviert werden können. Weitere zahlreiche Untersuchungen an transgenen Tieren bestätigen die vielseitigen Mechanismen, die im lebenden Organismen Defizite ausgleichen können. Die vorliegenden Untersuchungen der 12/15-Lipoxygenase in der Alox15-Knockout-Maus zeigen, dass dieses Enzym nicht die Rolle in der Ätiopathogenese der Insulinresistenz spielt, die man nach den Versuchen von DRANSFELD et al. (2001) erwarten konnte, jedenfalls nicht in der Maus. Die vollständige Hemmung der Insulin-induzierten Glukoseaufnahme, die in den Kardiomyozyten festgestellt wurde, hätte in den Knockout-Tieren eine Insulinresistenz auslösen müssen. Es ist unumstritten, dass die 12/15-Lipoxygenase eine Rolle bei der Insulin-induzierten GLUT4-Translokation spielt. Gerade die bisherigen Ergebnisse der Membranfraktionierung von Herz und Skelettmuskel unserer Arbeitsgruppe (nicht veröffentlicht) bestätigen die Bedeutung der 12/15-Lipoxygenase. Allerdings zeigt sich hier der Unterschied zwischen *in vitro* Versuchen an kultivierten Zelllinien und Untersuchungen an einem lebenden Organismus als ganzheitliches System. Wie eingangs erwähnt, bestätigt die vorliegende Arbeit die Notwendigkeit der Überprüfung *in vitro* aufgestellter Hypothesen in einem physiologischen System.

## 4.7 Ausblick

Mit den vorliegenden Untersuchungen sollte die Charakterisierung der Alox15-Knockout-Tiere nicht abgeschlossen werden. Da durch diese Arbeit Störungen an mehreren Stellen der Insulinsignalkaskade ausgeschlossen werden konnten, sollte im weiteren die GLUT4-Translokation in Herz und Skelettmuskel eingehender untersucht werden. Dazu ist eine Membran-Fraktionierung von Herz und Skelettmuskelgewebe im Basalzustand sowie nach Insulinstimulus erforderlich. So könnte im Vergleich zum Wildtyp eine eventuell verminderte Translokation des Glukose-transporters GLUT4 zur Plasmamembran nachgewiesen werden.

In unserer Arbeitsgruppe wurde mittlerweile eine Membranfraktionierung an beiden Geweben vorgenommen. Die bisherigen Ergebnisse (nicht veröffentlicht) geben Hinweise auf einen verminderten GLUT4-Gehalt in der Plasmamembran der Alox15-Knockout-Tiere im Vergleich zum Wildtyp und deuten somit eine gestörte GLUT4-Translokation an. Diese Versuche sind noch nicht abgeschlossen und zeigen bisher nur eine Tendenz, da noch keine repräsentative Anzahl untersucht worden ist. Eine weitere notwendige Untersuchung wäre die Darstellung des Aktinfilament-Netzwerkes mit einer speziellen Färbung in den untersuchten Geweben. So könnte die direkte Auswirkung des Verlustes der 12/15-Lipoxygenase auf die Regulation des Aktinfilament-Netzwerk festgestellt werden.

Weiterhin sollte eine Messung des 12(S)-HETE-Gehaltes erfolgen, um zu untersuchen inwieweit eine Kompensation durch andere Isoformen erfolgt ist. In diesem Zusammenhang wären ebenfalls Expressionsstudien verschiedener Lipoxygenase-Isoformen erforderlich.

Um die Hypothese zu verifizieren bzw. zu widerlegen, dass die Tiere keine Insulinresistenz entwickelt haben, sollten weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Unter anderem wäre es interessant, den Insulingehalt im Serum zu messen, welcher bei Insulinresistenz erhöht wäre. Die Untersuchung der Funktion der 12/15-Lipoxygenase in der Alox15-Knockout-Maus sollte mit dieser Arbeit nicht abgeschlossen werden.

## 5. ZUSAMMENFASSUNG

Die Aufrechterhaltung der Glukosehomöostase wird im erster Linie von dem Polypeptidhormon Insulin gesteuert. Durch Bindung von Insulin an den Insulinrezeptor wird die Insulinsignalkaskade aktiviert und somit die Translokation des Glukosetransporters GLUT4 zur Plasmamembran reguliert. Dort vermittelt GLUT4 die Aufnahme von Glukose in die Zelle. Diese Translokation geschieht über ein Aktinfilament-Netzwerk, das sich nach Insulinstimulus aus Aktinfilamenten umbildet. Es gilt als erwiesen, dass Metaboliten der 12/15-Lipoxygenase an der Regulation dieses Netzwerkes beteiligt sind und somit Einfluss auf den Transport von GLUT4 zur Plasmamembran und damit auf die Glukoseaufnahme haben. In Untersuchungen konnte eine vollständige Hemmung der Glukoseaufnahme in Kardiomyozyten, die mit einem Lipoxygenase-Inhibitor behandelt wurden, festgestellt werden. Aufgrund dieser Daten sollte die Funktion der 12/15-Lipoxygenase in einem Knockoutmodell näher charakterisiert werden.

In der vorliegenden Arbeit konnte keine veränderte GLUT4-Expression festgestellt werden. Die Akt-Expression war lediglich im Skelettmuskel der männlichen Alox15-Knockout-Tiere signifikant vermindert. Die Phosphorylierung der Akt nach Insulinstimulus war in Herz und Skelettmuskel der Knockout-Tiere bei beiden Geschlechtern unverändert. In beiden Geweben der Alox15-Knockout-Tiere konnte keine veränderte GSK3 $\alpha$ - oder - $\beta$ -Expression festgestellt werden. Die Phosphorylierung der beiden Isoformen nach Insulinstimulus war ebenfalls unverändert. Aufgrund der vorliegenden Ergebnisse hat der Verlust der 12/15-Lipoxygenase keinen Einfluss auf den GLUT4-Gehalt. Die Insulinsignalkaskade wird ebenfalls nicht beeinflusst. Eine Aussage über eine veränderte GLUT4-Translokation kann anhand dieser Daten nicht gemacht werden. Um eine Störung durch den Verlust des Enzyms genauer feststellen zu können, müsste das Aktinfilament-Netzwerk und die GLUT4-Translokation in den Knockout-Tieren näher untersucht werden.

Die Insulinresistenz ist die erste pathologische Störung, die bei der Entwicklung eines Diabetes mellitus Typ 2 auftritt. Durch eine verminderte Wirkung des Insulins in den insulinsensitiven Geweben (Skelettmuskel, Leber, Fettgewebe, Herz), kommt es zu einer verminderten Aufnahme von Glukose in die Zelle und damit zu einem erhöhten Blutglukosespiegel. Umgekehrt kann aber auch eine Störung der GLUT4-Translokation eine Insulinresistenz auslösen. In der vorliegenden Arbeit sollten deshalb die Knockout-Tiere auch in Hinblick auf die Entwicklung einer Insulinresistenz untersucht werden.

Es konnten keine veränderten Plasmaglukosespiegel bei den Alox15-Knockout-Tieren nachgewiesen werden. Auch nach Insulinstimulus kam es bei der Knockout-Maus zu einem physiologischen Abfall des Plasmaglukosespiegels. Die GLUT4-Expression sowie die Expression und Phosphorylierung der Signalelemente Akt und GSK3 waren unverändert (s.o.). Lediglich die Akt-Expression im Skelettmuskel der männlichen Tiere war signifikant vermindert.

Aufgrund dieser Daten haben die Knockout-Tiere keine Insulinresistenz entwickelt. Die verminderte Akt-Expression gibt ebenfalls keinen Hinweis auf eine Insulinresistenz. Um diese Daten abzusichern, sollten weitere Untersuchungen vorgenommen werden. Anhand der vorliegenden Ergebnisse ist davon auszugehen, dass in den Alox15-Knockout-Tieren spezifische Kompensationsmechanismen aktiviert wurden, die die Entwicklung einer Insulinresistenz verhindert haben. Weitere Untersuchungen dieser Mechanismen müssten durchgeführt werden.



## 6. SUMMARY

The maintenance of glucose homeostasis is primarily regulated by the polypeptide hormone insulin. Insulin rapidly stimulates glucose transport by inducing the translocation of vesicles containing the glucose transporter isoform 4 (GLUT4) from intracellular pools to the plasma membrane. When inserted in the plasma membrane, GLUT4 catalyses the glucose uptake into the cell. Actin cytoskeletal elements are involved in mediating the insulin-induced GLUT4 translocation. Metabolites of the 12/15-Lipoxygenase have recently been shown to contribute to the regulation of actin cytoskeleton rearrangement and therefore to the GLUT4 translocation and glucose uptake. Inhibition of 12/15-lipoxygenase activity completely abrogated insulin induced glucose uptake and GLUT4 translocation in cardiomyocytes. Based on these data the implication of 12/15-lipoxygenase was investigated in knockout mouse model.

The results obtained show no effect on the total expression of GLUT4. Akt expression was only decreased in skeletal muscle of the male knockout mice. The phosphorylation of Akt after stimulation with insulin was not altered in heart and skeletal muscle of male and female knockout mice. In both tissues the expression and phosphorylation of GSK3 $\alpha\beta$  were also unchanged. These data suggest that the loss of 12/15-lipoxygenase has no effect on GLUT4 level and the insulin signal transduction. Studies on actin cytoskeleton structure and GLUT4 translocation will be required to potentially demonstrate the functional consequences of 12/15-lipoxygenase knockout.

Insulin resistance is the first pathological disorder in the development of diabetes mellitus type 2. The decreased effect of insulin in insulin sensitive tissues (skeletal muscle, liver, adipose tissue, heart) results in a decreased glucose uptake into the cell and therefore in increased blood glucose level. Oppositely a disorder in GLUT4 translocation can also produce an insulin resistance.

Therefore in this work the development of insulin resistance should be examined in the Alox15 knockout mouse model.

These results show that plasma glucose levels in Alox15-knockout animals are unchanged. Also, after stimulation with insulin the decrease of blood glucose levels was physiological.

These data suggest that the knockout animals develop no insulin resistance. Also the decreased Akt expression gives no evidence for an insulin resistance. To confirm these data, further investigations should be done. It seems that in the Alox15 knockout mouse a specific mechanism of compensation has been activated, which prevents the development of insulin resistance. Further Investigations of these mechanisms should be done.

## 7. SCHRIFTTUMSVERZEICHNIS

ABEL, E.D. (2004):

*Glucose Transport in the Heart*

Front. Biosci. 9, 201-215

ACCILI, D.; DRAGO, J.; LEE, E.J.; JOHNSON, M.D.; COOL, M.H.; SALVATORE, P.; ASICO, L.D.; JOSE, P.A.; TAYLOR, S.I.; WESTPHAL, H. (1996):

*Early Neonatal Death in Mice Homozygous for a Null Allele of the Insulin Receptor Gene*

Nat. Genet. 12, 106-109

ALBERTI, K.G.; ZIMMET, P.Z. (1998):

*Definition, Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus and its Complications.*

*Part 1: Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus Provisional Report of a WHO Consultation*

Diabet. Med. 15, 539-553

ALI, A.; HOEFLICH, K.P.; WOODGETT, J.R. (2001):

*Glycogen Synthase Kinase-3: Properties, Functions, and Regulation*

Chem. Rev. 101, 2527-2540

ARAKI, E.; LIPES, M.A.; PATTI, M.E.; BRUNING, J.C.; HAAG, B. 3<sup>rd</sup>;

JOHNSON, R.S.; KAHN, C.R. (1994):

*Alternative Pathway of Insulin Signalling in Mice with Targeted Disruption of the IRS-1 Gene*

Nature 372, 186-190

BIRNBAUM, M.J. (1989):

*Identification of a Novel Gene Encoding an Insulin-Responsive Glucose Transporter Protein*

Cell 57, 305-315

BLEICH, D.; CHEN, S.; ZIPSER, B.; SUN, D.; FUNK, C.D.; NADLER, J.L. (1999):

*Resistance to Type 1 Diabetes Induction in 12-Lipoxygenase Knockout Mice*

J. Clin. Invest. 103, 1431-1436

BOITARD, C. (2002):

*The Origin of Type 1 Diabetes: An Autoimmune Disease?*

Diabetes Metab. 28, 263-265

BRADFORD, M.M. (1976):

*A Rapid and Sensitive Method for the Quantitation of Microgram Quantities of Protein Utilizing the Principle of Protein-Dye Binding*

Anal. Biochem. 72, 248-254

- BRASH, A.R. (1999):  
*Lipoxygenases: Occurrence, Functions, Catalysis, and Acquisition of Substrate*  
J. Biol. Chem. 274, 23679-23682
- BREITBART, E.; SOFER, Y.; SHAINBERG, A.; GROSSMAN, S. (1996):  
*Lipoxygenase Activity in Heart Cells*  
FEBS Lett. 395, 148-152
- BROZINICK, J.T Jr.; ROBERTS, B.R.; DOHM, G.L. (2003):  
*Defective Signaling Through Akt-2 and -3 But Not Akt-1 in Insulin-Resistant Human Skeletal Muscle: Potential Role in Insulin Resistance*  
Diabetes 52, 935-940
- BROZINICK, J.T Jr.; HAWKINS, E.D.; STRAWBRIDGE, A.B.; ELMENDORF, J.S. (2004):  
*Disruption of Cortical Actin in Skeletal Muscle Demonstrates an Essential Role of the Cytoskeleton in Glucose Transporter 4 Translocation in Insulin-Sensitive Tissues*  
J. Biol. Chem. 279, 40699-40706
- BRYANT, N.J.; GOVERS, R.; JAMES, D.E. (2002):  
*Regulated Transport of the Glucose Transporter GLUT4*  
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 3, 267-277
- BUSS, F.; LUZIO, J.P.; KENDRICK-JONES, J. (2002):  
*Myosin VI, an Actin Motor for Membrane Traffic and Cell Migration*  
Traffic 3, 851-858
- CARPENTER, C.L. (2000):  
*Actin Cytoskeleton and Cell Signaling*  
Crit. Care Med. 28, N94-99
- CARVALHO, E.; RONDINONE, C.; SMITH, U. (2000):  
*Insulin Resistance in Fat Cells from Obese Zucker Rats - Evidence for an Impaired Activation and Translocation of Protein Kinase B and Glucose Transporter 4*  
Mol. Cell Biochem. 206, 7-16
- CAVAGHAN, M.K.; EHRMANN, D.A.; POLONSKY, K.S. (2000):  
*Interactions Between Insulin Resistance and Insulin Secretion in the Development of Glucose Intolerance*  
J. Clin. Invest. 106, 329-333
- CHARRON, M.J.; BROSIUS, F.C. 3<sup>rd</sup>; ALPER, S.L.; LODISH, H.F. (1989):  
*A Glucose Transport Protein Expressed Predominately in Insulin-Responsive Tissues*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86, 2535-2539

- CHEN, H.; BERNSTEIN, B.W.; BAMBURG, J.R. (2000):  
*Regulating Actin-Filament Dynamics in vivo*  
Trends Biochem. Sci. 25, 19-23
- CHEN, Y.Q.; DUNIEC, Z.M.; LIU, B.; HAGMANN, W.; GAO, X.; SHIMOJI, K.;  
MARNETT, L.J.; JOHNSON, C.R.; HONN, K.V. (1994):  
*Endogenous 12(S)-HETE Production by Tumor Cells and its Role in Metastasis*  
Cancer Res. 54, 1574-1579
- CHIASSON, J.L.; JOSSE, R.G.; GOMIS, R.; HANEFELD, M.; KARASIK, A.;  
LAAKSO, M. (2002):  
*Acarbose for Prevention of Type 2 Diabetes Mellitus: the STOP-NIDDM Randomised Trial*  
Lancet 359, 2072-2077
- CHO, H.; MU, J.; KIM, J.K.; THORVALDSEN, J.L.; CHU, Q.; CRENSHAW, E.B. 3<sup>rd</sup>;  
KAESTNER, K.H.; BARTOLOMEI, M.S.; SHULMAN, G.I.; BIRNBAUM, M.J. (2001):  
*Insulin Resistance and a Diabetes Mellitus-Like Syndrome in Mice Lacking the Protein Kinase Akt2 (PKB beta)*  
Science 292, 1728-1731
- CLINE, G.W.; PETERSEN, K.F.; KRSSAK, M.; SHEN, J.; HUNDAL, R.S.;  
TRAJANOSKI, Z.; INZUCCHI, S.; DRESNER, A.; ROTHMAN, D.L.; SHULMAN, G.I. (1999):  
*Impaired Glucose Transport as a Cause of Decreased Insulin-Stimulated Muscle Glycogen Synthesis in Type 2 Diabetes*  
N. Engl. J. Med. 341, 240–246
- COFFER, P.J.; JIN, J.; WOODGETT, J.R. (1998):  
*Protein Kinase B (c-Akt): A Multifunctional Mediator of Phosphatidylinositol 3-Kinase Activation*  
Biochem. J. 335, 1-13
- CUSHMAN, S.W.; WARDZALA, L.J. (1980):  
*Potential Mechanism of Insulin Action on Glucose Transport in the Isolated Rat Adipose Cell. Apparent Translocation of Intracellular Transport Systems to the Plasma Membrane.*  
J. Biol. Chem. 255, 4758-4762
- CYRUS, T.; WITZTUM, J.L.; RADER, D.J.; TANGIRALA, R.; FAZIO, S.;  
LINTON, M.F.; FUNK, C.D. (1999):  
*Disruption of the 12/15-Lipoxygenase Gene Diminishes Atherosclerosis in Apo E-Deficient Mice*  
J. Clin. Invest. 103, 1597-1604

- CZECH, M.P.; CORVERA, S. (1999):  
*Signaling Mechanisms that Regulate Glucose Transport*  
J. Biol. Chem. 274, 1865-1868
- DAVIDSON, N.O.; HAUSMAN, A.M.; IFKOVITS, C.A.; BUSE, J.B.; GOULD, G.W.; BURANT, C.F.; BELL, G.I. (1992):  
*Human Intestinal Glucose Transporter Expression and Localization of GLUT5*  
Am. J. Physiol. 262, C795-800
- DAWSON, P.A.; MYCHALECKYJ, J.C.; FOSSEY, S.C.; MIHIC, S.J.; CRADDOCK, A.L.; BOWDEN, D.W. (2001):  
*Sequence and Functional Analysis of GLUT10: A Glucose Transporter in the Type 2 Diabetes-Linked Region of Chromosome 20q12-13.1*  
Mol. Genet. Metab. 74, 186-199
- DeFRONZO, R.A.; GUNNARSSON, R.; BJORKMAN, O.; OLSSON, M.; WAHREN, J. (1985):  
*Effects of Insulin on Peripheral and Splanchnic Glucose Metabolism in NonInsulin-Dependent (Type II) Diabetes Mellitus*  
J. Clin. Invest. 76, 149-155
- DEVENDRA, D.; LIU, E.; EISENBARTH, G.S. (2004):  
*Type 1 Diabetes: Recent Developments*  
BMJ 328, 750-754
- DING, X.Z.; HENNIG, R.; ADRIAN, T.E. (2003):  
*Lipoxygenase and Cyclooxygenase Metabolism: New Insights in Treatment and Chemoprevention of Pancreatic Cancer*  
Mol. Cancer 2, 10
- DOBLE, B.W.; WOODGETT, J.R. (2003):  
*GSK-3: Tricks of the Trade for a Multi-Tasking Kinase*  
J. Cell. Sci. 116, 1175-1186
- DOEGE, H.; BOCIANSKI, A.; JOOST, H.G.; SCHURMANN, A. (2000a):  
*Activity and Genomic Organization of Human Glucose Transporter 9 (GLUT9), a Novel Member of the Family of Sugar-Transport Facilitators Predominantly Expressed in Brain and Leucocytes*  
Biochem. J. 350, 771-776
- DOEGE, H.; SCHURMANN, A.; BAHRENBURG, G.; BRAUERS, A.; JOOST H.G. (2000b):  
*GLUT8, a Novel Member of the Sugar Transport Facilitator Family with Glucose Transport Activity*  
J. Biol. Chem. 275, 16275-16280

- DOEGE, H.; BOCIANSKI, A.; SCHEEPERS, A.; AXER, H.; ECKEL, J.; JOOST, H.G.; SCHURMANN, A. (2001):  
*Characterization of Human Glucose Transporter (GLUT) 11 (Encoded by SLC2A11), a Novel Sugar-Transport Facilitator Specifically Expressed in Heart and Skeletal Muscle*  
Biochem. J. 359, 443-449
- DOMINICZAK, M.H. (2003):  
*Linking Research and Innovative Clinical Practice: The Story of Diabetes Mellitus*  
Clin. Chem. Lab. Med. 41, 1104-1106
- DRANSFELD, O.; RAKATZI, I.; SASSON, S.; GRUZMAN, A.; SCHMITT, M.; HAUSSINGER, D.; ECKEL, J. (2001):  
*Eicosanoids Participate in the Regulation of Cardiac Glucose Transport by Contribution to a Rearrangement of Actin Cytoskeletal Elements*  
Biochem. J. 359, 47-54
- EITEL, K.; STAIGER, H.; BRENDDEL, M.D.; BRANDHORST, D.; BRETZEL, R.G.; HARING, H.U.; KELLERER, M. (2002):  
*Different Role of Saturated and Unsaturated Fatty Acids in Beta-Cell Apoptosis*  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 299, 853-856
- EITEL, K.; STAIGER, H.; RIEGER, J.; MISCHAK, H.; BRANDHORST, D.; BRENDDEL, M.; BRETZEL, R.G.; HARING, H.U.; KELLERER, M. (2003):  
*Protein Kinase C-Delta Activation and Translocation to the Nucleus are Required for Fatty Acid-Induced Apoptosis of Insulin-Secreting Cells*  
Diabetes 52, 991-997
- ELMENDORF, J.S. (2002):  
*Signals that Regulate GLUT4 Translocation*  
J. Membr. Biol. 190, 167-174
- ERIKSSON, J.; KORANYI, L.; BOUREY, R.; SCHALIN-JANTTI, C.; WIDEN, E.; MUECKLER, M.; PERMUTT, A.M.; GROOP, L.C. (1992):  
*Insulin Resistance in Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetic Patients and Their Relatives is Not Associated with a Defect in the Expression of the Insulin-Responsive Glucose Transporter (GLUT-4) Gene in Human Skeletal Muscle*  
Diabetologia 35, 143-147
- FLETCHER, L.M.; WELSH, G.I.; OATEY, P.B.; TAVARE, J.M. (2000):  
*Role for the Microtubule Cytoskeleton in GLUT4 Vesicle Trafficking and in the Regulation of Insulin-Stimulated Glucose Uptake*  
Biochem. J. 352, 267-276

- FRAME, S.; COHEN, P. (2001):  
*GSK3 Takes Centre Stage More Than 20 Years After Its Discovery*  
Biochem. J. 359, 1-16
- FREIRE-MOAR, J.; ALAVI-NASSAB, A.; NG, M.; MULKINS, M.; SIGAL, E. (1995):  
*Cloning and Characterization of a Murine Macrophage Lipoxygenase*  
Biochim. Biophys. Acta 1254, 112-116
- FRUMAN, D.A.; MEYERS, R.E.; CANTLEY, L.C. (1998):  
Phosphoinositide Kinases  
Annu. Rev. Biochem. 67, 481-507
- FUKUMOTO, H.; SEINO, S.; IMURA, H.; SEINO, Y.; EDDY, R.L.; FUKUSHIMA, Y.; BYERS, M.G.; SHOWS, T.B.; BELL, G.I. (1988):  
*Sequence, Tissue Distribution, and Chromosomal Localization of mRNA Encoding a Human Glucose Transporter-Like Protein*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85, 5434-5438
- FUKUMOTO, H.; KAYANO, T.; BUSE, J.B.; EDWARDS, Y.; PILCH, P.F.; BELL, G.I.; SEINO, S. (1989):  
*Cloning and Characterization of the Major Insulin-Responsive Glucose Transporter Expressed in Human Skeletal Muscle and Other Insulin-Responsive Tissues*  
J. Biol. Chem. 264, 7776-7779
- FUNK, C.D.; KEENEY, D.S.; OLIW, E.H.; BOEGLIN, W.E.; BRASH, A.R. (1996):  
*Functional Expression and Cellular Localization of a Mouse Epidermal Lipoxygenase*  
J. Biol. Chem. 271, 23338-23344
- FUNK C.D. (1996)  
*The Molecular Biology of Mammalian Lipoxygenases and the Quest for Eicosanoid Functions Using Lipoxygenase-Deficient Mice*  
Biochim. Biophys. Acta 1304, 65-84
- FUNK, C.D. (2001):  
*Prostaglandins and Leukotrienes: Advances in Eicosanoid Biology*  
Science 294, 1871-1875
- GALUSKA, D.; RYDER, J.; KAWANO, Y.; CHARRON, M.J.; ZIERATH, J.R. (1998):  
*Insulin Signaling and Glucose Transport in Insulin Resistant Skeletal Muscle. Special Reference to GLUT4 Transgenic and GLUT4 Knockout Mice*  
Adv. Exp. Med. Biol. 441, 73-85



GARVEY, W.T.; MAIANU, L.; ZHU, J.H.; BRECHTEL-HOOK, G.; WALLACE, P.; BARON, A.D. (1998):

*Evidence for Defects in Trafficking and Translocation of GLUT4 Glucose Transporters in Skeletal Muscle as a Cause of Human Insulin Resistance*  
J. Clin. Invest. 101, 2377-2386

GIANI, G.; JANKA, H.U.; HAUNER, H.; STANDL, E.; SCHIEL, R.; NEU, A.; RATHMANN, W.; ROSENBAUER, J. (2004):

*Epidemiologie und Verlauf des Diabetes mellitus in Deutschland*  
Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG. Scherbaum, W.A.; Kiess, W. (Hrsg.).  
2. Auflage. Deutsche Diabetes-Gesellschaft

GOLDSTEIN, B.J. (2003):

*Insulin Resistance: From Benign to Type 2 Diabetes Mellitus*  
Rev. Cardiovasc. Med. 6, S3-10

GOODYEAR, L.J.; HIRSHMAN, M.F.; NAPOLI, R.; CALLES, J.; MARKUNS, J.F.; LJUNGQVIST, O.; HORTON, E.S. (1996):

*Glucose Ingestion Causes GLUT4 Translocation in Human Skeletal Muscle*  
Diabetes 45, 1051-1056

GOULD, G.W.; THOMAS, H.M.; JESS, T.J.; BELL, G.I. (1991):

*Expression of Human Glucose Transporters in Xenopus Oocytes: Kinetic Characterization and Substrate Specificities of the Erythrocyte, Liver, and Brain Isoforms*  
Biochemistry 30, 5139-5145

HAJDUCH, E.; LITHERLAND, G.J.; HUNDAL, H.S. (2001):

*Protein Kinase B (PKB/Akt)—A Key Regulator of Glucose Transport?*  
FEBS Lett. 492, 199-203

HAMBERG, M.; SAMUELSSON, B. (1974):

*Prostaglandin Endoperoxides. Novel Transformations of Arachidonic Acid in Human Platelets*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 71, 3400-3404

HAMMES, H.P. (2004):

*Diabetische Retinopathie*  
in: Schatz (Hrsg.), Diabetologie kompakt 3.Aufl., 280-289

HAN, X.; CHEN, S.; SUN, Y.; NADLER, J.L.; BLEICH, D. (2002):

*Induction of Cyclooxygenase-2 Gene in Pancreatic Beta-Cells by 12-Lipoxygenase Pathway Product 12-Hydroxyeicosatetraenoic Acid*  
Mol. Endocrinol. 16, 2145-2154

HANDBERG, A.; VAAG, A.; DAMSBO, P.; BECK-NIELSEN, H. VINTEN, J. (1990):  
*Expression of Insulin Regulatable Glucose Transporters in Skeletal Muscle From Type 2 (Non-Insulin-Dependent) Diabetic Patients*  
Diabetologia 33, 625-627

HOLMAN, G.D.; KASUGA, M. (1997):  
*From Receptor to Transporter: Insulin Signalling to Glucose Transport*  
Diabetologia 40, 991-1003

HOLMAN, G.D.; SANDOVAL, I.V. (2001):  
*Moving the Insulin-Regulated Glucose Transporter GLUT4 Into and Out of Storage*  
Trends Cell Biol. 11, 173-179

IBBERSON, M.; ULDRY, M.; THORENS, B. (2000):  
*GLUTX1, a Novel Mammalian Glucose Transporter Expressed in the Central Nervous System and Insulin-Sensitive Tissues*  
J. Biol. Chem. 275, 4607-4612

JAMES, D.E.; BROWN, R.; NAVARRO, J.; PILCH, P.F. (1988):  
*Insulin regulatable Tissues Express a Unique Insulin-Sensitive Glucose Transport Protein*  
Nature 333, 183-185

JAMES, D.E.; STRUBE, M.; MUECKLER, M. (1989):  
*Molecular Cloning and Characterization of an Insulin-Regulatable Glucose Transporter*  
Nature 338, 83-87

JOSHI, R.L.; LAMOTHE, B.; CORDONNIER, N.; MESBAH, K.; MONTHIOUX, E.; JAMI, J.; BUCCHINI, D. (1996):  
*Targeted Disruption of the Insulin Receptor Gene in the Mouse Results in Neonatal Lethality*  
EMBO J. 15, 1542-1547

KAHN, C.R. (2003):  
*Knockout Mice Challenge Our Concepts of Glucose Homeostasis and the Pathogenesis of Diabetes*  
Exp. Diabetes Res. 4, 169-182

KAHN, S.E. (2003):  
*The Relative Contributions of Insulin Resistance and Beta-Cell Dysfunction to the Pathophysiology of Type 2 Diabetes*  
Diabetologia 46, 3-19

KAHN, B.B.; ROSEN, A.S.; BAK, J.F.; ANDERSEN, P.H.; DAMSBO, P.; LUND, S.; PEDERSEN, O. (1992):

*Expression of GLUT1 and GLUT4 Glucose Transporters in Skeletal Muscle of Humans with Insulin-Dependent Diabetes Mellitus: Regulatory Effects of Metabolic Factors*

J. Clin. Endocrinol. Metab. 74, 1101-1109

KANE, S.; SANO, H.; LIU, S.C.; ASARA, J.M.; LANE, W.S.; GARNER, C.C.; LIENHARD, G.E. (2002):

*A Method to Identify Serine Kinase Substrates. Akt Phosphorylates a Novel Adipocyte Protein with a Rab GTPase-Activating Protein (GAP) Domain*

J. Biol. Chem. 277, 22115-22118

KANG, L.T., VANDERHOEK, J.Y. (1998):

*Mono(S)Hydroxy Fatty Acids: Novel Ligands for Cytosolic Actin*

J. Lipid Res. 39, 1476-1482

KANG, L.T.; PHILLIPS, T.M.; VANDERHOEK, J.Y. (1999):

*Novel Membrane Target Proteins for Lipoxygenase-Derived Mono(S)hydroxy Fatty Acids*

Biochim. Biophys. Acta 1438, 388-398

KANOH, Y.; BANDYOPADHYAY, G.; SAJAN, M.P.; STANDAERT, M.L.; FARESE, R.V. (2000):

*Thiazolidinedione Treatment Enhances Insulin Effects on Protein Kinase C-Zeta/Lambda Activation and Glucose Transport in Adipocytes of Nondiabetic and Goto-Kakizaki Type 2 Diabetic Rats*

J Biol. Chem. 275, 16690-16696

KANZAKI, M.; PESSIN, J.E. (2001):

*Insulin-Stimulated GLUT4 Translocation in Adipocytes is Dependent upon Cortical Actin Remodeling*

J. Biol. Chem. 276, 42436-42444

KATZ, E.B.; STENBIT, A.E.; HATTON, K.; DePINHO, R.; CHARRON, M.J. (1995):  
*Cardiac and Adipose Tissue Abnormalities but Not Diabetes in Mice Deficient in GLUT4*

Nature 377, 151-155

KAYANO, T.; FUKUMOTO, H.; EDDY, R.L.; FAN, Y.S.; BYERS, M.G.; SHOWS, T.B.; BELL, G.I. (1988):

*Evidence for a Family of Human Glucose Transporter-Like Proteins. Sequence and Gene Localization of a Protein Expressed in Fetal Skeletal Muscle and Other Tissues*

J. Biol. Chem. 263, 15245-15248

- KAYANO, T.; BURANT, C.F.; FUKUMOTO, H.; GOULD, G.W.; FAN, Y.S.; EDDY, R.L.; BYERS, M.G.; SHOWS, T.B.; SEINO, S.; BELL, G.I. (1990):  
*Human Facilitative Glucose Transporters, Isolation, Functional Characterization, and Gene Localization of cDNAs Encoding an Isoform (GLUT5) Expressed in Small Intestine, Kidney, Muscle, and Adipose Tissue and an Unusual Glucose Transporter Pseudogene-Like Sequence (GLUT6)*  
J. Biol. Chem. 265, 13276-13282
- KELLERER, M.; LAMMERS, R.; HARING, H.U. (1999):  
*Insulin Signal Transduction: Possible Mechanisms for Insulin Resistance*  
Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes 107, 97-106
- KELLERER, M.; HENNIGE, A.; HÄRING, H.U. (2004):  
*Pathogenese des Typ-2-Diabetes*  
in: Schatz, H. (Hrsg.), Diabetologie kompakt, 3.Aufl., 117-125
- KERNER W.; FUCHS C.; REDAELLI M.; BOEHM B.O.; KÖBBERLING J.; SCHERBAUM W.A.; TILLIL H. (2001)  
*Definition, Klassifikation und Diagnostik des Diabetes mellitus*  
Evidenzbasierte Diabetes-Leitlinien DDG. Scherbaum WA, Lauterbach KW, Joost HG (Hrsg.). 1. Auflage. Deutsche Diabetes-Gesellschaft
- KHAN, A.H.; PESSIN, J.E. (2002):  
*Insulin Regulation of Glucose Uptake: A Complex Interplay of Intracellular Signalling Pathways*  
Diabetologia 45, 1475-1483
- KHAYAT, Z.A.; TONG, P.; YAWORSKY, K.; BLOCH, R.J.; KLIP, A. (2000):  
*Insulin-Induced Actin Filament Remodeling Colocalizes Actin with Phosphatidylinositol 3-Kinase and GLUT4 in L6 Myotubes*  
J. Cell Sci. 113, 279-290
- KIM, Y.B.; NIKOULINA, S.E.; CIARALDI, T.P.; HENRY, R.R.; KAHN, B.B. (1999):  
*Normal Insulin-Dependent Activation of Akt/Protein Kinase B, with Diminished Activation of Phosphoinositide 3-Kinase, in Muscle in Type 2 Diabetes*  
J. Clin. Invest. 104, 733-741
- KIM, Y.S.; REDDY, M.A.; LANTING, L.; ADLER, S.G.; NATARAJAN, R. (2003):  
*Differential Behavior of Mesangial Cells Derived from 12/15-Lipoxygenase Knockout Mice Relative to Control Mice*  
Kidney Int. 64, 1702-1714

KNOWLER, W.C.; BARRETT-CONNOR, E.; FOWLER, S.E.; HAMMAN, R.F.; LACHIN, J.M.; WALKER, E.A.; NATHAN, D.M. (2002):

*Reduction in the Incidence of Type 2 Diabetes with Lifestyle Intervention or Metformin*

*N. Engl. J. Med.* 346, 393-403

KOHN, A.D.; SUMMERS, S.A.; BIRNBAUM, M.J.; ROTH, R.A. (1996):

*Expression of a Constitutively Active Akt Ser/Thr Kinase in 3T3-L1 Adipocytes Stimulates Glucose Uptake and Glucose Transporter 4 Translocation*

*J. Biol. Chem.* 271, 31372-31378

KOISTINEN, H.A.; ZIERATH, J.R. (2002):

*Regulation of Glucose Transport in Human Skeletal Muscle*

*Ann. Med.* 34, 410-418

KROOK, A.; KAWANO, Y.; SONG, X.M.; EFENDIC, S.; ROTH, R.A.;

WALLBERG-HENRIKSSON, H.; ZIERATH, J.R. (1997):

*Improved Glucose Tolerance Restores Insulin-Stimulated Akt Kinase Activity and Glucose Transport in Skeletal Muscle from Diabetic Goto-Kakizaki Rats*

*Diabetes* 46, 2110-2114

KROOK, A.; ROTH, R.A.; JIANG, X.J.; ZIERATH, J.R.;

WALLBERG-HENRIKSSON, H. (1998):

*Insulin-Stimulated Akt Kinase Activity is Reduced in Skeletal Muscle from NIDDM Subjects*

*Diabetes* 47, 1281-1286

KUBOTA, N.; TOBE, K.; TERAUCHI, Y.; ETO, K.; YAMAUCHI, T.; SUZUKI, R.; TSUBAMOTO, Y.; KOMEDA, K.; NAKANO, R.; MIKI, H.; SATOH, S.; SEKIYAMA, H.; SCACCHITANO, S.; LESNIAK, M.; AIZAWA, S.; NAGAI, R.; KIMURA, S.; AKANUMA, Y.; TAYLOR, S.I.; KADOWAKI, T. (2000):

*Disruption of Insulin Receptor Substrate 2 Causes Type 2 Diabetes Because of Liver Insulin Resistance and Lack of Compensatory Beta-Cell Hyperplasia*

*Diabetes* 49, 1880-1889

KUHN, H.; THIELE, B.J. (1999):

*The Diversity of the Lipoxygenase Family. Many Sequence Data But Little Information on Biological Significance*

*FEBS Lett.* 449, 7-11

KUROWSKI, T.G.; LIN, Y.; LUO, Z.; TSICHLIS, P.N.; BUSE, M.G.; HEYDRICK, S.J.; RUDERMAN, N.B. (1999):

*Hyperglycemia Inhibits Insulin Activation of Akt/Protein Kinase B but Not Phosphatidylinositol 3-Kinase in Rat Skeletal Muscle*

*Diabetes* 48, 658-663

- KUZUYA, T.; MATSUDA, A. (1997):  
*Classification of Diabetes on the Basis of Etiologies versus Degree of Insulin Deficiency*  
Diabetes Care, 20, 219-20
- LAUBE, H. (2001):  
*Ursachen der Insulinresistenz: Pathobiochemie und Pathophysiologie*  
in: Insulinresistenz, 1.Aufl. 18-33
- LAWLOR, M.A.; ALESSI, D.R. (2001):  
*PKB/Akt: A Key Mediator of Cell Proliferation, Survival and Insulin Responses?*  
J. Cell Sci. 114, 2903-2910
- LEITER, E.H. (2002):  
*Mice with Targeted Gene Disruptions or Gene Insertions for Diabetes Research: Problems, Pitfalls, and Potential Solutions*  
Diabetologia 45, 296-308
- LENG, Y.; KARLSSON, H.K.; ZIERATH, J.R. (2004):  
*Insulin Signaling Defects in Type 2 Diabetes*  
Rev. Endocr. Metab. Disord. 5, 111-117
- LINN, T.; LANG, U. (2004):  
*Gestationsdiabetes*  
in: Schatz (Hrsg.), Diabetologie kompakt, 3.Aufl. 226-231
- LISINSKI, I.; SCHURMANN, A.; JOOST, H.G.; CUSHMAN, S.W.; AL-HASANI, H. (2001):  
*Targeting of GLUT6 (Formerly GLUT9) and GLUT8 in Rat Adipose Cells*  
Biochem. J. 358, 517-522
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.E. (2001):  
*Zellbewegung und Zellgestalt I: Mikrofilamente*  
in: Molekulare Zellbiologie, 4.Auflage, 813-860
- LODISH, H.; BERK, A.; ZIPURSKY, S.L.; MATSUDAIRA, P.; BALTIMORE, D.; DARNELL, J.E. (2001):  
*Genaustausch und transgene Tiere*  
in: Molekulare Zellbiologie, 4.Auflage, 308-317
- MARTIN, S.; TELLAM, J.; LIVINGSTONE, C.; SLOT, J.W.; GOULD, G.W.; JAMES, D.E. (1996):  
*The Glucose Transporter (GLUT-4) and Vesicle-Associated Membrane Protein-2 (VAMP-2) are Segregated from Recycling Endosomes in Insulin-Sensitive Cells*  
J. Cell Biol. 134, 625-635

- MARTINEZ, A.; CASTRO, A.; DORRONSORO, I.; ALONSO, M. (2002):  
*Glycogen Synthase Kinase 3 (GSK-3) Inhibitors as New Promising Drugs for Diabetes, Neurodegeneration, Cancer, and Inflammation*  
Med. Res. Rev. 22, 373-384
- MAUVAIS-JARVIS, F.; KULKARNI, R.N.; KAHN, C.R. (2002):  
*Knockout Models are Useful Tools to Dissect the Pathophysiology and Genetics of Insulin Resistance*  
Clin. Endocrinol. (Oxf.) 57, 1-9
- McVIE-WYLIE, A.J.; LAMSON, D.R.; CHEN, Y.T. (2001):  
*Molecular Cloning of a Novel Member of the GLUT Family of Transporters, SLC2a10 (GLUT10), Localized on Chromosome 20q13.1: A Candidate Gene for NIDDM Susceptibility*  
Genomics 72, 113-117
- MILLER, Y.I.; CHANG, M.K.; FUNK, C.D.; FERAMISCO, J.R.; WITZTUM, J.L. (2001):  
*12/15-Lipoxygenase Translocation Enhances Site-Specific Actin Polymerization in Macrophages Phagocytosing Apoptotic Cells*  
J. Biol. Chem. 276, 19431-19439
- MILLER, Y.I.; WORRALL, D.S.; FUNK, C.D.; FERAMISCO, J.R.; WITZTUM, J.L. (2003):  
*Actin Polymerization in Macrophages in Response to Oxidized LDL and Apoptotic Cells: Role of 12/15-Lipoxygenase and Phosphoinositide 3-Kinase*  
Mol. Biol. Cell 14, 4196-4206
- MIURA, T.; SUZUKI, W.; ISHIHARA, E.; ARAI, I.; ISHIDA, H.; SEINO, Y.; TANIGAWA, K. (2001):  
*Impairment of Insulin-Stimulated GLUT4 Translocation in Skeletal Muscle and Adipose Tissue in the Tsumura Suzuki Obese Diabetic Mouse: A New Genetic Animal Model of Type 2 Diabetes*  
Eur. J. Endocrinol. 145, 785-790
- MOORADIAN, A.D. (2003):  
*Cardiovascular Disease in Type 2 Diabetes Mellitus: Current Management Guidelines*  
Arch. Intern. Med. 163, 33-40
- MUECKLER, M.; CARUSO, C.; BALDWIN, S.A.; PANICO, M.; BLENCH, I.; MORRIS, H.R.; ALLARD, W.J.; LIENHARD, G.E.; LODISH, H.F. (1985):  
*Sequence and Structure of a Human Glucose Transporter*  
Science 229, 941-945

- MUECKLER, M. (1994):  
*Facilitative Glucose Transporter*  
Eur. J. Biochem. 219, 713-725
- NAUCK, M.A. (2000)  
*Diabetes Mellitus und andere Störungen des Kohlenhydratstoffwechsels*  
In: Pathophysiologie; Fölsch, Kochsiek, Schmidt: 353-376
- NAWROTH, P.P.; BIERHAUS, A. (1999):  
*Pathophysiologie diabetischer Spätschäden*  
In: Nawroth, P.P. (Hrsg.), Kompendium Diabetologie, 1.Aufl., 34-81
- NIE, D.; TANG, K.; SZEKERES, K.; LI, L.; HONN, K.V. (2000):  
*Eicosanoid Regulation of Angiogenesis in Human Prostate Carcinoma and Its Therapeutic Implications*  
Ann. N.Y. Acad. Sci. 905, 165-176
- NIKOULINA, S.E.; CIARALDI, T.P.; MUDALIAR, S.; MOHIDEEN, P.; CARTER, L.; HENRY, R.R. (2000):  
*Potential Role of Glycogen Synthase Kinase-3 in Skeletal Muscle Insulin Resistance of Type 2 Diabetes*  
Diabetes 49, 263-271
- OMATA, W.; SHIBATA, H.; LI, L.; TAKATA, K.; KOJIMA, I. (2000):  
*Actin Filaments Play a Critical Role in Insulin-Induced Exocytotic Recruitment but Not in Endocytosis of GLUT4 in Isolated Rat Adipocytes*  
Biochem. J. 346, 321-328
- PAIGEN, K. (2003):  
*One Hundred Years of Mouse Genetics: An Intellectual History. II. The Molecular Revolution (1981-2002)*  
Genetics 163, 1227-1235
- PATEL, N.; RUDICH, A.; KHAYAT, Z.A.; GARG, R.; KLIP, A. (2003):  
*Intracellular Segregation of Phosphatidylinositol-3,4,5-Trisphosphate by Insulin-Dependent Actin Remodeling in L6 Skeletal Muscle Cells*  
Mol. Cell. Biol. 23, 4611-4626
- PEDERSEN, O.; BAK, J.F.; ANDERSEN, P.H.; LUND, S.; MOLLER, D.E.; FLIER, J.S.; KAHN, B.B. (1990):  
*Evidence Against Altered Expression of GLUT1 or GLUT4 in Skeletal Muscle of Patients with Obesity or NIDDM*  
Diabetes 39, 865-870



- PESSIN, J.E.; THURMOND, D.C.; ELMENDORF, J.S.; COKER, K.J.; OKADA, S. (1999):  
*Molecular Basis of Insulin-Stimulated GLUT4 Vesicle Trafficking. Location! Location! Location!*  
J. Biol. Chem. 274, 2593-2596
- PESSIN, J.E.; SALTIEL, A.R. (2000):  
*Signaling Pathways in Insulin Action: Molecular Targets of Insulin Resistance*  
J. Clin. Invest. 106, 165-169
- PEYROLLIER, K.; HAJDUCH, E.; GRAY, A.; LITHERLAND, G.J.; PRESCOTT, A.R.; LESLIE, N.R.; HUNDAL, H.S. (2000):  
*A Role for the Actin Cytoskeleton in the Hormonal and Growth-Factor-Mediated Activation of Protein Kinase B*  
Biochem. J. 352, 617-622
- PFOHL, M (2004):  
*Diagnostische Kriterien des Diabetes mellitus und der gestörten Glukosetoleranz*  
in: Schatz, H. (Hrsg.), Diabetologie kompakt 3.Aufl., 255-262
- PHAY, J.E.; HUSSAIN, H.B.; MOLEY, J.F. (2000):  
*Strategy for Identification of Novel Glucose Transporter Family Members by Using Internet-Based Genomic Databases*  
Surgery 128, 946-951
- PLOUG, T.; RALSTON, E. (2002):  
*Exploring the Whereabouts of GLUT4 in Skeletal Muscle (Review)*  
Mol. Membr. Biol. 19, 39-49
- PRATICO, D.; ZHUKAREVA, V.; YAO, Y.; URYU, K.; FUNK, C.D.; LAWSON, J.A.; TROJANOWSKI, J.Q.; LEE, V.M. (2004):  
*12/15-Lipoxygenase is Increased in Alzheimer's Disease: Possible Involvement in Brain Oxidative Stress*  
Am. J. Pathol. 164, 1655-1662
- QUALMANN, B.; KESSELS, M.M.; KELLY, R.B. (2000):  
*Molecular Links Between Endocytosis and the Actin Cytoskeleton*  
J. Cell Biol. 150, F111-116
- REDDY, M.A.; KIM, Y.S.; LANTING, L.; NATARAJAN, R. (2003):  
*Reduced Growth Factor Responses in Vascular Smooth Muscle Cells Derived from 12/15-Lipoxygenase-Deficient Mice*  
Hypertension 41, 1294-1300

RICE, R.L.; TANG, D.G.; HADDAD, M.; HONN, K.V.; TAYLOR, J.D. (1998):  
*12(S)-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Increases the Actin Microfilament Content in B16a Melanoma Cells: A Protein Kinase-Dependent Process*  
Int. J. Cancer 77, 271-278

RIDLEY, A.J.; PATERSON, H.F.; JOHNSTON, C.L.; DIEKMANN, D.; HALL, A. (1992):  
*The Small GTP-Binding Protein Rac Regulates Growth Factor-Induced Membrane Ruffling*  
Cell 70, 401-410

ROGERS, S.L.; GELFAND, V.I. (2000):  
*Membrane Trafficking, Organelle Transport, and the Cytoskeleton*  
Curr. Opin. Cell Biol. 12, 57-62

ROGERS, S.; MACHEDA, M.L.; DOCHERTY, S.E.; CARTY, M.D.; HENDERSON, M.A.; SOELLER, W.C.; GIBBS, E.M.; JAMES, D.E.; BEST, J.D. (2002):  
*Identification of a Novel Glucose Transporter-Like Protein-GLUT-12*  
Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 282, E733-738

ROSS, S.A.; GULVE, E.A.; WANG, M. (2004):  
*Chemistry and Biochemistry of Type 2 Diabetes*  
Chem. Rev. 104, 1255-1282

RUAN, H.; ZARNOWSKI, M.J.; CUSHMAN, S.W.; LODISH, H.F. (2003):  
*Standard Isolation of Primary Adipose Cells from Mouse Epididymal Fat Pads Induces Inflammatory Mediators and Down-Regulates Adipocyte Genes*  
J. Biol. Chem. 278, 47585-47593

RUDICH, A.; KLIP, A. (2003):  
*Push/Pull Mechanisms of GLUT4 Traffic in Muscle Cells*  
Acta Physiol. Scand. 178, 297-308

SANO, H.; KANE, S.; SANO, E.; MIINEA, C.P.; ASARA, J.M.; LANE, W.S.; GARNER, C.W.; LIENHARD, G.E. (2003):  
*Insulin-Stimulated Phosphorylation of a Rab GTPase-Activating Protein Regulates GLUT4 Translocation*  
J. Biol. Chem. 278, 14599-14602

SASAKI, T.; MINOSHIMA, S.; SHIOHAMA, A.; SHINTANI, A.; SHIMIZU, A.; ASAKAWA, S.; KAWASAKI, K.; SHIMIZU, N. (2001):  
*Molecular Cloning of a Member of the Facilitative Glucose Transporter Gene Family GLUT11 (SLC2A11) and Identification of Transcription Variants*  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 289, 1218-1224

- SAVAGE, P.J. (1996):  
*Cardiovascular Complications of Diabetes Mellitus: What We Know and What We Need to Know About Their Prevention*  
Ann. Intern. Med. 124, 123-126
- SCHLEICHER, E. (2004):  
*Pathobiochemie der Makroangiopathie, Mikroangiopathie und Neuropathie*  
in: Schatz, H. (Hrsg.), Diabetologie kompakt 3.Aufl., 255-262
- SCHMITZ, V. (2003):  
*Untersuchungen zum Einfluss von experimentellen Diabetes auf die vaskuläre Reaktivität*  
Dissertation, Math.-Nat. Fakultät an der Rheinischen Friedrich-Wilhelms-Universität zu Bonn
- SHAO, J.; YAMASHITA, H.; QIAO, L.; FRIEDMAN, J.E. (2000):  
*Decreased Akt Kinase Activity and Insulin Resistance in C57BL/KsJ-Lepr<sup>db/db</sup> Mice*  
J. Endocrinol. 167, 107-115
- SHAW, J.E.; CHISHOLM, D.J. (2003):  
*1: Epidemiology and Prevention of Type 2 Diabetes and the Metabolic Syndrome*  
Med. J. Aust. 179, 379-383
- SHULMAN, G.I.; ROTHMAN, D.L.; JUE, T.; STEIN, P.; DeFRONZO, R.A.;  
SHULMAN, R.G. (1990):  
*Quantitation of Muscle Glycogen Synthesis in Normal Subjects and Subjects with Non-Insulin-Dependent Diabetes by <sup>13</sup>C Nuclear Magnetic Resonance Spectroscopy*  
N. Engl. J. Med. 322, 223-228
- SHULMAN, G.I. (2000):  
*Cellular Mechanisms of Insulin Resistance*  
J. Clin. Invest. 106, 171-176
- SMALL, J.V.; ROTTNER, K.; HAHNE, P.; ANDERSON, K.I. (1999):  
*Visualising the Actin Cytoskeleton*  
Microsc. Res. Tech. 47, 3-17
- STARKE A.A.R. (2000)  
*Pathobiochemie, Pathophysiologie und Pathogenese des Stoffwechselsyndroms Typ-2-Diabetes*  
In: Berger, M. (Hrsg.); Diabetes mellitus, 2. Aufl., 423-444

STENBIT, A.E.; TSAO, T.S.; LI, J.; BURCELIN, R.; GEENEN, D.L.; FACTOR, S.M.; HOUSEKNECHT, K.; KATZ, E.B.; CHARRON, M.J. (1997):

*GLUT4 Heterozygous Knockout Mice Develop Muscle Insulin Resistance and Diabetes*

Nat. Med. 3, 1096–1101

SUN, D.; FUNK, C.D. (1996):

*Disruption of 12/15-Lipoxygenase Expression in Peritoneal Macrophages. Enhanced Utilization of the 5-Lipoxygenase Pathway and Diminished Oxidation of Low Density Lipoprotein.*

J. Biol. Chem. 271, 24055-24062

SUN, D.; McDONELL, M.; CHEN, X.S.; LAKKIS, M.M.; LI, H.; ISAACS, S.N.; ELSEA, S.H.; PATEL, P.I.; FUNK, C.D. (1998):

*Human 12(R)-Lipoxygenase and the Mouse Ortholog. Molecular Cloning, Expression, and Gene Chromosomal Assignment*

J. Biol. Chem. 273, 33540-33547

SUZUKI, K.; KONO, T. (1980):

*Evidence That Insulin Causes Translocation of Glucose Transport Activity to the Plasma Membrane from an Intracellular Storage Site*

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77, 2542-2545

TAHA, C.; KLIP, A. (1999):

*The Insulin Signaling Pathway*

J. Membr. Biol. 169, 1-12

TAMEMOTO, H.; KADOWAKI, T.; TOBE, K.; YAGI, T.; SAKURA, H.;

HAYAKAWA, T.; TERAUCHI, Y.; UEKI, K.; KABURAGI, Y.; SATOH, S.; et al. (1994):

*Insulin Resistance and Growth Retardation in Mice Lacking Insulin Receptor Substrate-1*

Nature 372, 182-186

TANG, D.G.; DIGLIO, C.A.; HONN, K.V. (1993a):

*12(S)-HETE-Induced Microvascular Endothelial Cell Retraction Results from PKC-Dependent Rearrangement of Cytoskeletal Elements and Alpha V Beta 3 Integrins*

Prostaglandins 45, 249-267

TANG, D.G.; TIMAR, J.; GROSSI, I.M.; RENAUD, C.; KIMLER, V.A.; DIGLIO, C.A.; TAYLOR, J.D.; HONN, K.V. (1993b):

*The Lipoxygenase Metabolite, 12(S)-HETE, Induces a Protein Kinase C-Dependent Cytoskeletal Rearrangement and Retraction of Microvascular Endothelial Cells*

Exp. Cell Res. 207, 361-375

- TANG, D.G.; DIGLIO, C.A.; HONN, K.V. (1994):  
*Activation of Microvascular Endothelium by Eicosanoid 12(S)-Hydroxyeicosatetraenoic Acid Leads to Enhanced Tumor Cell Adhesion Via Up-Regulation of Surface Expression of Alpha v Beta 3 Integrin: A Posttranscriptional, Protein Kinase C- and Cytoskeleton-Dependent Process*  
Cancer Res. 54(4), 1119-1129
- TANG, D.G.; CHEN, Y.Q.; HONN, K.V. (1996):  
*Arachidonate Lipoxygenases as Essential Regulators of Cell Survival and Apoptosis*  
Proc. Natl. Acad. Sci. USA 93, 5241-5246
- THEWS, G.; MUTSCHLER, E.; VAUPEL, P. (1999):  
*Hormonales System*  
in: Anatomie, Physiologie, Pathophysiologie des Menschen, 5. Aufl., S.513
- TONG, P.; KHAYAT, Z.A.; HUANG, C.; PATEL, N.; UEYAMA, A.; KLIP, A. (2001):  
*Insulin-Induced Cortical Actin Remodeling Promotes GLUT4 Insertion at Muscle Cell Membrane Ruffles*  
J. Clin. Invest. 108, 371-381
- TSAKIRIDIS, T.; VRANIC, M.; KLIP, A. (1994):  
*Disassembly of the Actin Network Inhibits Insulin-Dependent Stimulation of Glucose Transport and Prevents Recruitment of Glucose Transporters to the Plasma Membrane*  
J. Biol. Chem. 269, 29934-29942
- TSAKIRIDIS, T.; WANG, Q.; TAHA, C.; GRINSTEIN, S.; DOWNEY, G.; KLIP, A. (1997):  
*Involvement of the Actin Network in Insulin Signalling*  
Soc. Gen. Physiol. Ser. 52, 257-271
- UEKI, K.; YAMAMOTO-HONDA, R.; KABURAGI, Y.; YAMAUCHI, T.; TOBE, K.; BURGERING, B.M.; COFFER, P.J.; KOMURO, I.; AKANUMA, Y.; YAZAKI, Y.; KADOWAKI, T. (1998):  
*Potential Role of Protein Kinase B in Insulin-Induced Glucose Transport, Glycogen Synthesis, and Protein Synthesis*  
J. Biol. Chem. 273, 5315-5322
- ULDRY, M.; IBBERSON, M.; HORISBERGER, J.D.; CHATTON, J.Y.; RIEDERER, B.M.; THORENS, B. (2001):  
*Identification of a Mammalian H(+)-Myo-Inositol Symporter Expressed Predominantly in the Brain*  
EMBO J. 20, 4467-4477

- VALENTIJN, K.; VALENTIJN, J.A.; JAMIESON, J.D. (1999):  
*Role of Actin in Regulated Exocytosis and Compensatory Membrane Retrieval: Insights from an Old Acquaintance*  
Biochem. Biophys. Res. Commun. 266, 652-661
- VANHAESEBROECK, B.; LEEVERS, S.J.; PANAYOTOU, G.; WATERFIELD, M.D. (1997):  
*Phosphoinositide 3-Kinases: A Conserved Family of Signal Transducers*  
Trends Biochem. Sci. 22, 267-272
- VANHAESEBROECK, B.; ALESSI, D.R. (2000):  
*The PI3K-PDK1 Connection: More Than Just a Road to PKB*  
Biochem. J. 346, 561-576
- VISSER, C.J.M. (2001):  
*Mäuse*  
in: Gabrisch und Zwart (Hrsg.), Krankheiten der Heimtiere, 5.Aufl., 101-124
- VOLLENWEIDER, P. (2003):  
*Insulin Resistant States and Insulin Signaling*  
Clin. Chem. Lab. Med. 41, 1107-1119
- WALKER, K.S.; DEAK, M.; PATERSON, A.; HUDSON, K.; COHEN, P.; ALESSI, D.R. (1998):  
*Activation of Protein Kinase B Beta and Gamma Isoforms by Insulin in Vivo and by 3-Phosphoinositide-Dependent Protein Kinase-1 in Vitro: Comparison with Protein Kinase B Alpha*  
Biochem. J. 331, 299-308
- WALTERS, C.L.; WANG, B.C.; GODFREY, M.; SUN, D.; FUNK, C.D.; BLENDY, J.A. (2003):  
*Augmented Responses to Morphine and Cocaine in Mice with a 12-Lipoxygenase Gene Disruption*  
Psychopharmacology (Berl.) 170, 124-131
- WANG, Q.; BILAN, P.J.; TSAKIRIDIS, T.; HINEK, A.; KLIP, A. (1998):  
*Actin Filaments Participate in the Relocalization of Phosphatidylinositol-3-Kinase to Glucose Transporter-Containing Compartments and in the Stimulation of Glucose Uptake in 3T3-L1 Adipocytes*  
Biochem. J. 331, 917-928
- WANG, Q.; SOMWAR, R.; BILAN, P.J.; LIU, Z.; JIN, J.; WOODGETT, J.R.; KLIP, A. (1999):  
*Protein Kinase B/Akt Participates in GLUT4 Translocation by Insulin in L6 Myoblasts*  
Mol. Cell. Biol. 19, 4008-4018

- WHITE, M.F.; MARON, R.; KAHN, C.R. (1985):  
*Insulin Rapidly Stimulates Tyrosine Phosphorylation of a Mr-185,000 Protein in Intact Cells*  
Nature 318, 183-186
- WHITE, M.F. (1997):  
*The Insulin Signalling System and the IRS Proteins*  
Diabetologia 40, S2-17
- WHITE, M.F. (2003):  
*Insulin Signaling in Health and Disease*  
Science 302, 1710-1711
- WIJKANDER, J.; HOLST, L.S.; RAHN, T.; RESJO, S.; CASTAN, I.; MANGANIELLO, V.; BELFRAGE, P.; DEGERMAN, E. (1997):  
*Regulation of Protein Kinase B in Rat Adipocytes by Insulin, Vanadate and Peroxovanadate. Membrane Translocation in Response to Peroxovanadate.*  
J. Biol. Chem. 272, 21520-21526
- WITHERS, D.J.; GUTIERREZ, J.S.; TOWERY, H.; BURKS, D.J.; REN, J.M.; PREVIS, S.; ZHANG, Y.; BERNAL, D.; PONS, S.; SHULMAN, G.I.; BONNER-WEIR, S.; WHITE, M.F. (1998):  
*Disruption of IRS-2 Causes Type 2 Diabetes in Mice*  
Nature 391, 900-904
- WOOD, I.S.; TRAYHURN, P. (2003):  
*Glucose Transporters (GLUT and SGLT): Expanded Families of Sugar Transport Proteins*  
Br. J. Nutr. 89, 3-9
- WU, X.; LI, W.; SHARMA, V.; GODZIK, A.; FREEZE, H.H. (2002):  
*Cloning and Characterization of Glucose Transporter 11, a Novel Sugar Transporter that is Alternatively Spliced in Various Tissues*  
Mol. Genet. Metab. 76, 37-45
- YAMAMOTO, S.; SUZUKI, H.; UEDA, N. (1997):  
*Arachidonate 12-Lipoxygenases*  
Prog. Lipid Res. 36, 23-41
- ZELDIN, D. C. (2001):  
*Epoxygenase Pathways of Arachidonic Acid Metabolism*  
J. Biol. Chem. 276, 36059-36062
- ZERIAL, M.; McBRIDE, H. (2001):  
*Rab Proteins as Membrane Organizers*  
Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2, 107-117

ZIDEK, W. (2004):  
*Diabetische Nephropathie*  
in: Schatz, Diabetologie kompakt, 3.Aufl. 290-301

ZIERLER, K. (1999):  
*Whole Body Glucose Metabolism*  
Am. J. Physiol. 276, E409-426

ZIMMET, P.; ALBERTI, K.G.; SHAW, J. (2001):  
*Global and Societal Implications of the Diabetes Epidemic*  
Nature 414, 782-787



## 8. VERZEICHNIS DER ABKÜRZUNGEN

(v/v)	=	Volumen pro Volumen
°C	=	Grad Celsius
µl	=	Mikroliter
d	=	Stunde
DNA	=	Desoxyribonukleinsäure
h	=	Stunde
HMIT	=	Mammalian H(+)-Myo-Inositol
HPL	=	Plazentalaktogen
i.p.	=	intraperitoneal
kDa	=	Kilo Dalton
KG	=	Körpergewicht
min	=	Minuten
mmol	=	Millimol
PVDF	=	Polyvinylidendifluorid
RT	=	Raumtemperatur
SDS	=	Natriumdodecylsulfat
sec	=	Sekunde
Ser	=	Serin
TBS	=	Tris-gepufferte Kochsalzlösung
Thr	=	Threonin

Tris	=	(Hydroxymethyl)-aminomethan
Triton x-100	=	t-Octylphenoxypolyethoxyethanol
Tween 20	=	Polyoxyethylensorbitanmonolaurat
U	=	Unit
ü.N.	=	über Nacht

## 9. VERZEICHNIS DER ABBILDUNGEN UND TABELLEN

Abb. 1	Insulinwirkungen auf den Stoffwechsel
Abb. 2	Insulinsignalkaskade
Abb. 3	Modell für die Insulin-stimulierte GLUT4-Translokation in Skelettmuskelzellen
Abb. 4	Arachidonsäuremetabolismus
Abb. 5	12/15-LO-Expression in Wildtyp-Mäusen
Abb. 6	12/15-LO-Expression in Alox15-Knockout-Mäusen
Abb. 7	Genotypisierung der Alox15-Knockout-Maus
Abb. 8	Plasmaglukosespiegel im Basalzustand und nach Insulinstimulus
Abb. 9	GLUT4-Expression in Herz und Skelettmuskel
Abb. 10	Darstellung der Quantifizierung der GLUT4- Expression
Abb. 11	Akt-Expression
Abb. 12	Darstellung der Quantifizierung der Akt-Phosphorylierung im Herzen
Abb. 13	Akt-Phosphorylierung im Herzen
Abb. 14	Akt-Phosphorylierung im Skelettmuskel
Abb. 15	Darstellung der Quantifizierung der Akt-Phosphorylierung im Herzen
Abb. 16	Darstellung der Quantifizierung der Akt-Phosphorylierung im Skelettmuskel
Abb. 17	GSK3-Expression in Herz und Skelettmuskel
Abb. 18	Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\alpha\beta$ -Expression im Herzen
Abb. 19	Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\alpha\beta$ -Expression im Skelettmuskel
Abb. 20	GSK3 $\alpha\beta$ -Phosphorylierung im Herzen

Abb. 21	GSK3 $\alpha$ $\beta$ -Phosphorylierung im Skelettmuskel
Abb. 22	Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\alpha$ -Phosphorylierung im Herzen
Abb. 23	Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\alpha$ -Phosphorylierung im Skelettmuskel
Abb. 24	Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung im Herzen
Abb. 25	Darstellung der Quantifizierung der GSK3 $\beta$ -Phosphorylierung im Skelettmuskel
Tab. 1	Ätiologische Klassifikation des Diabetes mellitus
Tab. 2	Klassifizierung der Glukose-Transporter-Familie (GLUT)-Familie
Tab. 3	Durchschnittliches Alter und Körpergewicht der Alox15-Knockout- und C57/Bl6-Mäuse

## 10. DANKSAGUNG

Mein besonderer Dank geht an Herrn Prof. Dr. Jürgen Eckel, in dessen Arbeitsgruppe ich diese Arbeit erstellen konnte. Ihm danke ich für seine fachliche Betreuung, sein entgegengebrachtes Interesse an meiner Arbeit und seine stete Diskussionsbereitschaft.

Bei Herrn HDoz Dr. Andreas Moritz möchte ich mich ganz herzlich für die sehr gute Betreuung meiner Arbeit im Fachbereich Veterinärmedizin der Justus-Liebig-Universität Gießen bedanken.

Weiterhin möchte ich besonders Daniela Ledwig danken, die mir stets mit Rat und Tat zur Seite stand.

Ich danke außerdem Robert Schwenk, Mathias Uhlig, Katja Rakowski, Christiane Bellin und Verena Schmitz, für ihre fachliche Unterstützung und die lustigen Stunden außerhalb des Laboralltages. Weiterhin danke ich der gesamten Arbeitsgruppe für ihre Unterstützung und die angenehme Arbeitsatmosphäre.

Ich danke den Mitarbeitern des Tierbereichs für die Betreuung der Mäuse.

Für ihre Unterstützung möchte ich mich auch ganz herzlich bei meinen Eltern und meinen beiden Schwestern bedanken.

Ganz besonders möchte ich mich bei meinem Freund Stefan Cremers bedanken, der mir immer neuen Mut gemacht und mich in jeder Hinsicht unterstützt hat.